

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 9 月 18 日 (18.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/076412 A1

(51) 国際特許分類: C07D 233/90, 403/14,
487/04, A61K 31/4178, A61P 35/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02423

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 3 日 (03.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-63608 2002 年 3 月 8 日 (08.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市
本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉山 弘
(SUGIYAMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒102-0081 東京都 千

代田区 四番町 8-6 1 1 号 Tokyo (JP). 板東 俊和
(BANDO, Toshikazu) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都 文京
区 本郷 5-2 1-1 0 ハイマート大樹 3 0 5 号 Tokyo
(JP). 斎藤 烈 (SAITO, Isao) [JP/JP]; 〒607-8242 京都府
京都市 山科区 勤修寺 柴山 1-2 1 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区 日本橋三丁目 1 5 番 2 号 高愛ビル 9 階 Tokyo
(JP).

(81) 指定国 (国内): US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL HAIRPIN POLYAMIDE

(54) 発明の名称: 新規なヘアピン型ポリアミド

(57) Abstract: It is intended to provide a pyrrole-imidazole polyamide type functional molecule having enhanced abilities of alkylating DNA and recognizing a sequence, compared with the existing functional molecules of this type, for a specific base sequence occurring on DNA. A hairpin polyamide having an alkylation site via a vinyl linker at the end of a pyrrole-imidazole polyamide. Drugs for inhibiting the expression of a specific gene and anticancer agents containing the above hairpin polyamide.

(57) 要約: 本発明は、DNA 上に存在する特定の塩基配列に対して、従来のこの種の機能分子よりも更に高い DNA アルキル化能と配列認識能を兼ね備えたピロール-イミダゾールポリアミド系の機能分子を提供することを目的とする。本発明は、ピロール-イミダゾールポリアミドの末端にビニールリンカーを介してアルキル化反応部位を有するヘアピン型ポリアミドに関する。また、本発明は、上記ヘアピン型ポリアミドを含んでなる、特定遺伝子の発現を抑制する薬剤並びに抗ガン性を有する薬剤に関する。

WO 03/076412 A1

507,004

明 細 書

新規なヘアピン型ポリアミド

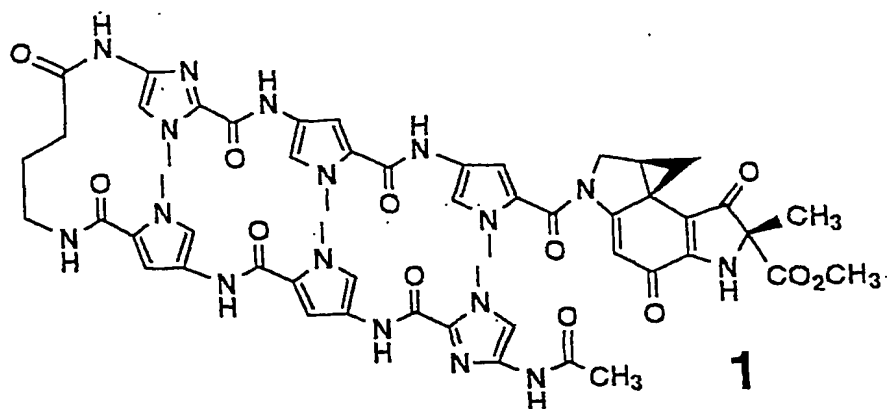
技術分野

本発明は、特定の遺伝子の発現を抑制し、高い抗ガン作用を有する新規で且つ極めて有用なヘアピン型ピロール-イミダゾールポリアミドに関する。

背景技術

ヒトの遺伝子配列の解明がほぼ完了した現在、ある特定の塩基配列に対して特異的な機能を有する分子に多くの研究者の注目が集まっている。例えばD e r v a nらは逆平行に配向したピロール (P y) -イミダゾール (I m) ポリアミドが塩基配列特異的にDNAのマイナーグループに結合することを見い出した (Bioorg. Med. Chem. 2001, 9, 2215; Curr. Opin. Str. Biol. 1997, 7, 355; J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 7636 等)。これらの分子は転写因子などに匹敵する結合定数と特異性を有しているので (J. Am Chem. Soc. 1998, 120, 3534; J. Am Chem. Soc. 1998, 120, 6219 等)、実際これらの分子を用いて遺伝子の発現の制御が既に検討されている (Nature, 1997, 387, 202; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 12890等)。しかしながら遺伝子の発現の制御は転写因子の結合を阻害することによって行われているため、ポリアミドが結合するターゲット配列は限られている (J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 4856)。

本発明者らはP y - I mポリアミドにデュオカルマイシンAのアルキル化部位であるセグメントA (D u) を結合したハイブリット分子1を先に開発し特許出願している (WO 00/15641号公報)。そのハイブリット分子1はP y - I mポリアミドによる配列認識能と450塩基対のDNAフラグメントの1ヶ所をアルキル化する (J. Am Chem. Soc. 1999, 121, 4961)。しかしながら、1によるDNAの配列特異的アルキル化反応は、完了するのに1週間以上要し、反応の効率も7%と低かった。



本発明者らは、また、アルキル化反応部位とPy-Imポリアミドとの間にビニルリンカーを挿入したImPyLDu86（Lはビニルリンカーを示す。以下同じ。）が2量体となって選択的にPyG（A/T）CPuという配列において5塩基離れた両方の鎖で反応することを見い出している（特開2000-281679号公報；J. Am Chem. Soc. 2000, 122, 1602）。この際、アルキル化部分の安定性を高めるためにサイクロプロピルインドール（CPI）であるDu86のセグメントAに変更した。この化合物は25 nMという低濃度においても、用いたImPyLDu86の70%がアルキル化を引き起こし、リンカー部の導入により反応性と効率が劇的に向上することが判明した。

発明の開示

本発明は、DNA上に存在する特定の塩基配列に対して、従来のこの種の機能分子よりも更に高いDNAアルキル化能と配列認識能を兼ね備えたピロールーイミダゾールポリアミド系の機能分子を提供することを目的とする。

本発明は、ピロールーイミダゾールポリアミドの末端にビニルリンカーを介してアルキル化反応部位を有するヘアピン型ポリアミドに関する。

また、本発明は、上記ヘアピン型ポリアミドを含んでなる、特定遺伝子の発現を抑制する薬剤に関する。

更に、本発明は、上記ヘアピン型ポリアミドを含んでなる、抗ガン性を有する薬剤に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、化合物1, 12-14によるDNA塩基配列特異的なアルキル化反応の比較を示す。

第2図は、化合物1と13の速度論的DNAアルキル化能を評価結果を示す。

第3図は、短鎖DNAに対する化合物1, 12-14の配列特異的なアルキル化能の評価結果を示す。

第4図は、化合物14-16の5'-TGACCA-3'配列に対する塩基配列特異的なDNAアルキル化反応について解析した結果を示す。

第5図は、化合物16及び23の塩基配列特異的なDNAアルキル化能の比較を示す。

第6図は、コード領域での遺伝子発現制御について調べた結果を示す。

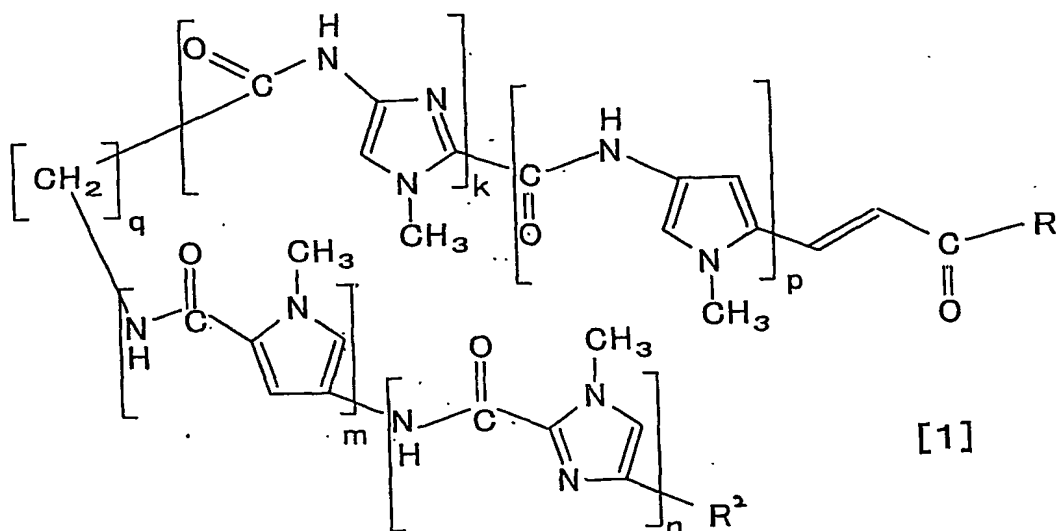
第7図は、化合物13の配列特異的なアルキル化によりコード領域でのmRNA転写が阻害されている状態を示す。

第8図は、ヒトがん細胞パネル（39がん細胞ライン）による抗がん効果の評価結果を示す。

第9図は、化合物13と14の39種ヒトがん細胞に対する抗細胞増殖活性の評価結果を示す。

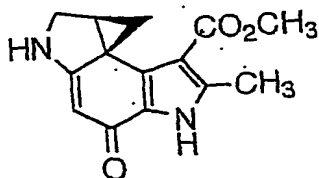
発明を実施するための最良の形態

上記本発明のヘアピン型ポリアミドとしては、例えば下記一般式〔1〕

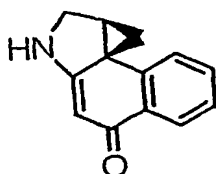


(式中、 R^1 はアルキル化反応部位を表し、 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセトアミド基を表し、 k , p , q , m 及び n はそれぞれ独立して自然数を表す。)で示される化合物が挙げられる。

上記一般式〔1〕において、 R^1 で表されるアルキル化反応部位としては、DNA上に存在する特定の塩基配列に対して、アルキル化能と配列認識能を兼ね備えた基であればどのような基でも良いが、例えば、下記構造式



で示されるCPIであるDU-86のセグメントA (Du86) の残基や、下記構造式

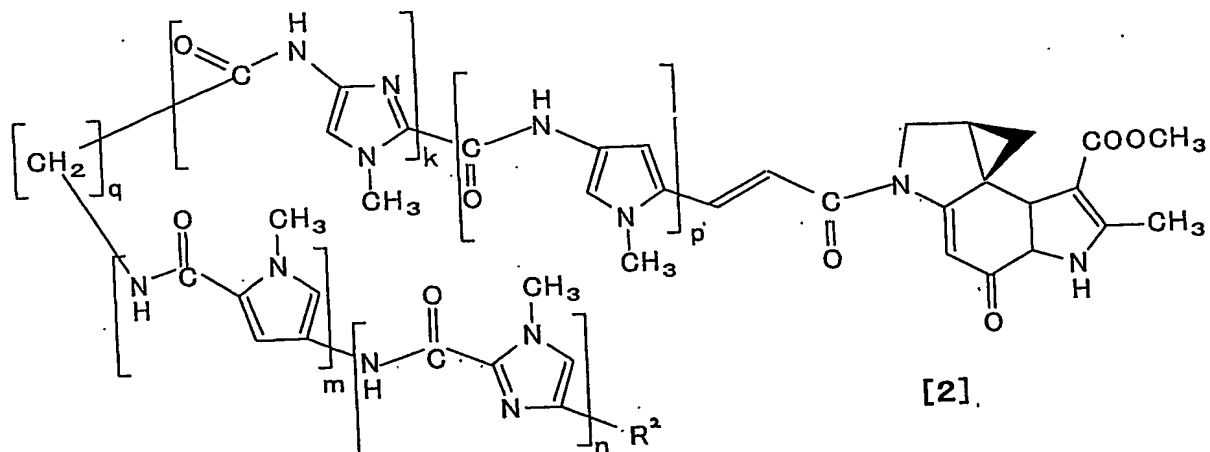


で示されるCBIである1, 2, 9, 9a-テトラヒドロシクロプロバ〔c〕ベンズ〔e〕インドール-4-オンの残基等が挙げられる。

一般式〔1〕において、 R^2 で表されるアルキルとしては、例えば炭素数1~20、好ましくは1~10、より好ましくは1~6の直鎖状又は分枝状の低級アルキル基が挙げられ、具体例としては、例えばメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。

また、 k , p , q , m , n で表される自然数としては、通常1~10位、好ましくは1~5位の自然数が挙げられる。

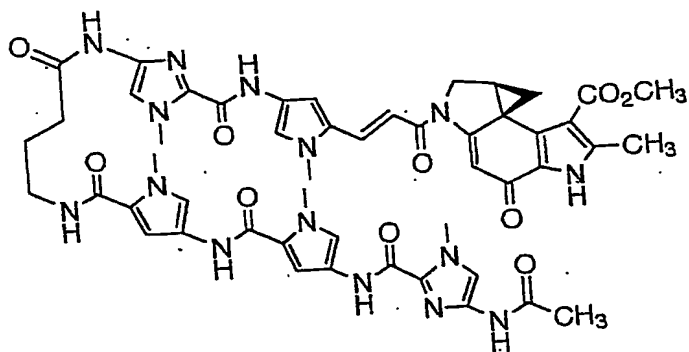
一般式〔1〕で示される化合物の例としては、例えば下記一般式〔2〕



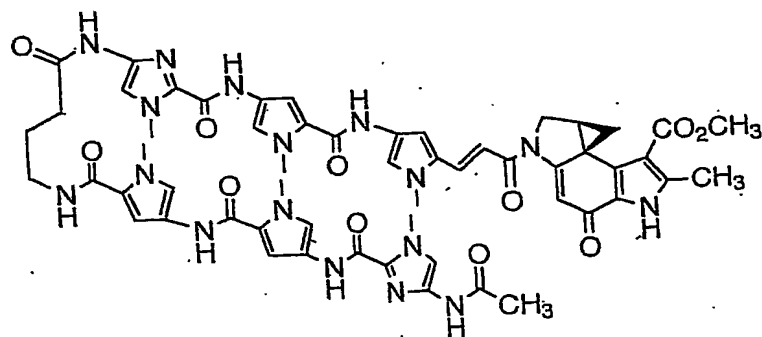
(式中、 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセトアミド基を表し、 k , p , q , m 及び n はそれぞれ独立して自然数を表す。)

で示される化合物が挙げられる。

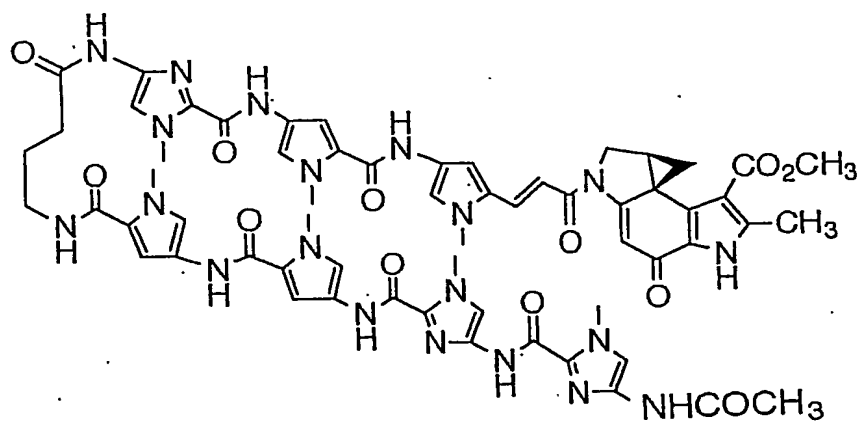
一般式 [2] で示される化合物の具体例としては、例えば下記構造式



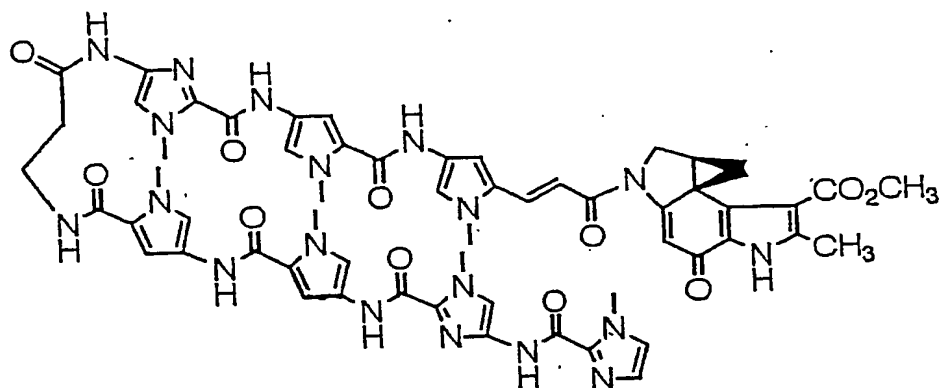
で示されるヘアピン型ポリアミド、下記構造式



で示されるヘアピン型ポリアミド、下記構造式

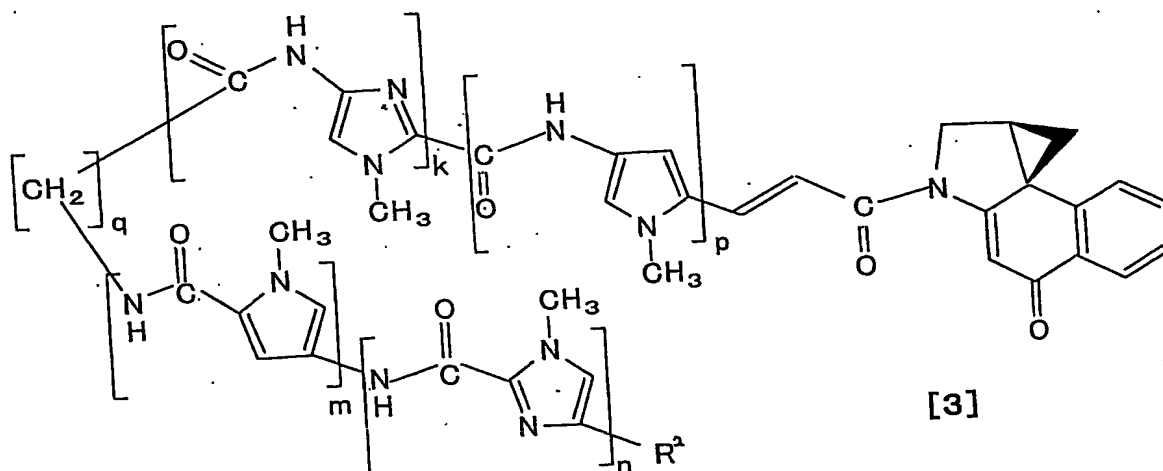


で示されるヘアピン型ポリアミド。下記構造式



で示されるヘアピン型ポリアミド等が挙げられる。

一般式 [1] で示される化合物の他の例としては、例えば下記一般式 [3]

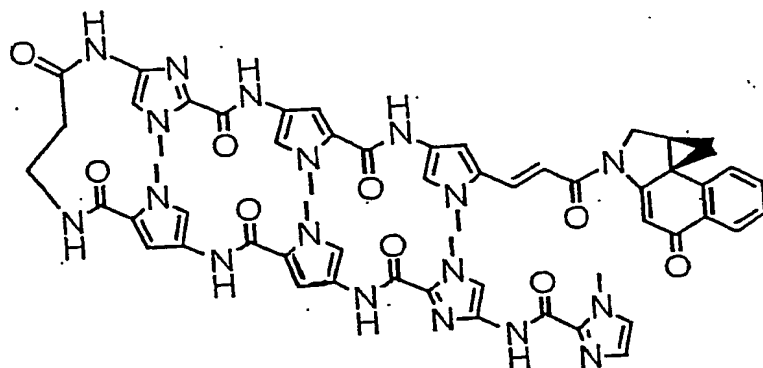


(式中、 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセトアミド基を表し、 k , p , q , m

及び n はそれぞれ独立して自然数を表す。)

で示される化合物が挙げられる。

一般式〔3〕で示される化合物の具体例としては、例えば下記構造式

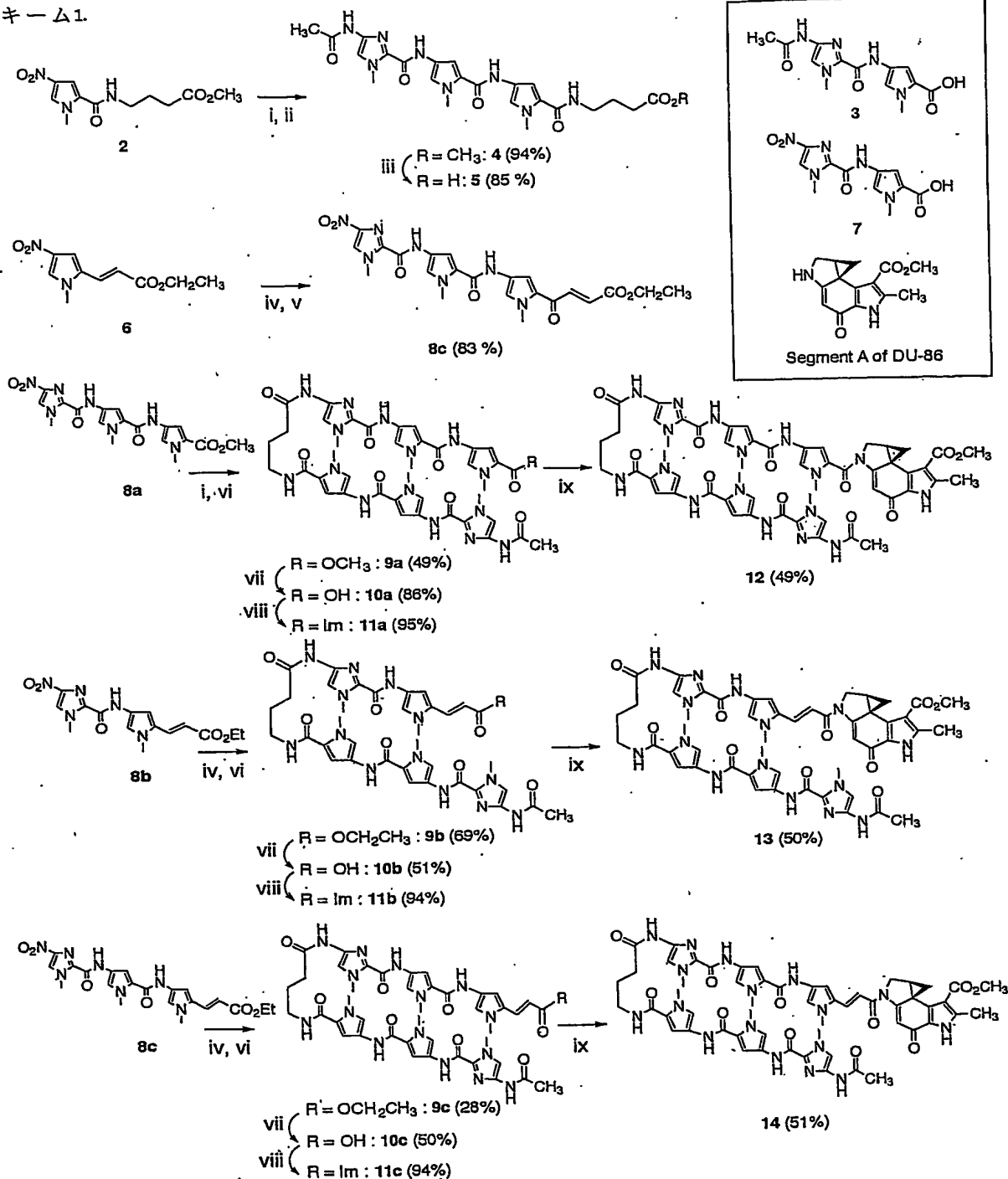


で示されるヘアピン型ポリアミド等が挙げられる。

本発明のヘアピン型ポリアミドの合成法の概略を化合物 1 3 及び 1 4 を例にして反応スキーム 1 に示す。

なお、反応スキーム 1 には、比較のために使用した既存のタイプのヘアピン型ポリアミド（化合物 1 2）の合成法も併せて示した。

反応スキーム 1.



即ち 2 と 3 のカップリングを市販の F D P P を用いて行いトリアミド 4 を合成した。その加水分解により得られるカルボン酸 5 を 1 2 - 1 4 の N 末端側の

半分にあたる共通のパーツとして利用した。8 a - c と 5 をカップリングすることによりヘアピンエステル 9 a - c を合成した。アルキル化部分としては、ポリアミド部分とのカップリング条件でより安定な D U 8 6 のセグメント A を用い、1 2 - 1 4 をそれぞれ合成した。最終化合物は H P L C により分取、精製をおこない、N M R 及びエレクトロスプレーマスにより構造確認した。

長鎖 DNA (400 bp) に対するアルキル化能

ヘアピンポリアミド 1、1 2 - 1 4 の DNA との反応について長鎖 DNA (p U C - I') を用いて検討した。アルキル化反応を 24 時間行いシークエンスゲル電気泳動を用いて解析した結果を第 1 図に示す。

比較の対象として用いた I m P y P y - γ - I m P y P y D u (1) はサイト 3 の 5' - G T C A G - 3' 配列の G で選択的に反応した。一方で、I m P y P y - γ - I m P y P y D u 8 6 (1 2) のアルキル化は 100 nM - 12.5 nM では観察できなかった (レーン 5 - 8)。更に 10 μ M まで濃度をあげても DNA は全く消失せず、アルキル化は起こらなかった。この事実は D u の方が D u 8 6 よりも高い反応性を有していることを示している。一方、ピロールを 1 つ除きビニルリンカーを挿入した I m P y P y - γ - I m P y L D u 8 6 (1 3) は 1 より優れたアルキル化能を示し、サイト 3 の G T C A G 配列の A (レーン 9 - 12) で反応した上、100 nM の条件ではほとんどの出発 DNA が消失した (レーン 9)。加えて I m P y P y - γ - I m P y P y にビニルリンカーを挿入した I m P y P y - γ - I m P y P y L D u 8 6 (1 4) は 1 3 と比較すれば若干反応性が低下しているものの、優先的にアルキル化する塩基配列がサイト 3 の G T C A G 配列の G と異なるマッチサイトであるサイト 7 やサイト 4、ミスマッチサイトであるサイト 2 でもアルキル化が進行し、1 とは配列特異性が異なっていたことが明らかとなった (レーン 13 - 16)。これらの結果は D u 8 6 の近傍の自由度が増したためと考えられる。なお、上記及び以下の記載において、 γ は γ -アミノ酪酸残基を表す。

更に 1 と 1 3 の反応性の差を詳細に調べるために、短い反応時間でのアルキル

化を解析した。その結果、興味深いことに13は5分という短時間での反応でもアルキル化が見られたが、1は1時間でもまだ反応していないことが明らかになった。これらのことは13は1に比べてDNAに対して劇的に配列特異的アルキル化のスピードが向上している事実を示している（第2図）。

短鎖DNA（10bp）に対するアルキル化

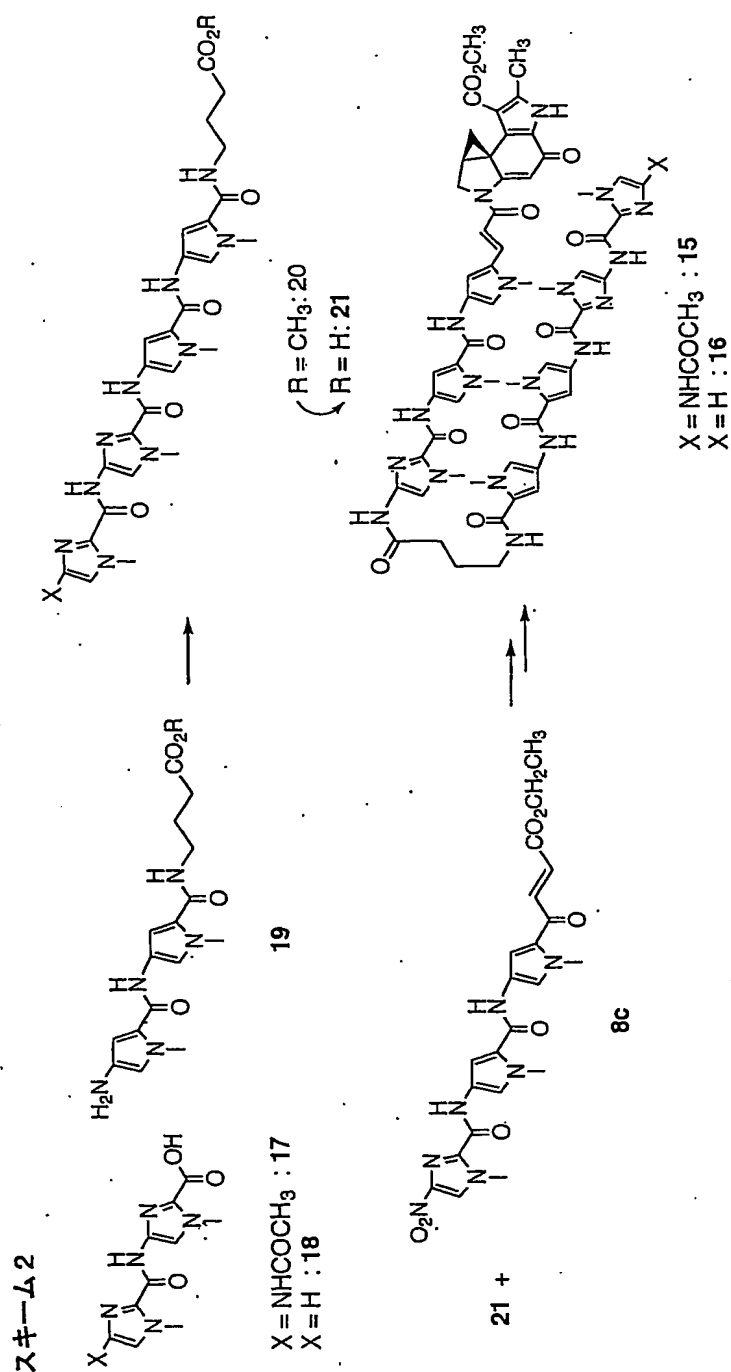
アルキル化サイトの反応塩基部を明確に確認するために、ポリアミド12、13、14によるアルキル化についてDNAオリゴマー5'-CAAGTCAGAG/5'-CTCTGACTTGを基質としてHPLCを用いて検討した。結果を第3図に示す。ポリアミドによって反応性に著しい違いがあったが、すべての場合において反応の進行に伴いアルキル化体と考えられるピークが観測された。更に加熱により分解し、先に本発明者らが論文に示した方法（Tetrahedron Lett. 1990, 31, 7197; Tetrahedron Lett. 1993, 34, 2179 等）によりオリゴマーの分解生成物を調べることにより、矢印のところでアルキル化反応が起こっていることが確認された。オリゴマーに対する反応性においても12の反応性は1と比較しても非常に悪いことが確認された（17hで13%、第3図）。この事実は長鎖DNAに対する反応性と同様DuとDu86の反応性の差から起因していると思われる。また逆に13は劇的な反応性の向上が見られた（5分で75%）。このことはアルキル化部位（Du86）の反応性よりもDNAマイナーグループ内における位置がDNAアルキル化能に重要な影響を与えていることを示している。14は短鎖DNAに対する反応性だけで見ると1とほぼ同等（2hで46%）であるが、13と比べると反応性が劣っている。

以上の結果から、13のような分子設計、即ちイミダゾール-ピロールヘアピン型ポリアミドとCPIアルキレーターの間にビニル基を配置したこと、それが、DNAアルキル化能の劇的な向上に大きく寄与していることが明らかになった。また、DNAアルキル化剤の塩基配列認識でもビニル基とセグメントAとの組み合わせは効果的に機能することが判明した。ここで合成したヘアピン型ポリアミド13及び14は、高いDNAアルキル化能を有した塩基配列特異的アルキル化剤であり、遺伝子発現制御やがん細胞に対する抗細胞増殖阻害活性の結果につい

ては後述する。

認識塩基配列を拡張した配列特異的アルキル化剤の分子設計

更に認識配列を拡張した機能分子として、14のN末端にイミダゾール環を付けたAcImImPyPy- γ -ImPyPyLDu86 (15)を設計した。更に、N末端のアルキル化能に与える影響も確認するために、アセチル基を削除したImImPyPy- γ -ImPyPyLDu86 (16)を設計した。合成方法はスキーム1と同様の方法で、カルボン酸17, 18とアミン体19とをFDPPによりカップリングを行い20を合成し、8cとのカップリング後、15, 16へと導いた。最終化合物はHPLCにより分取、精製をおこない、NMR及びエレクトロスプレーマスにより構造確認した(スキーム2)。



ヘアピンポリアミド14, 15, 16を比較するために長鎖DNA (pUC-I I) を用いるDNAアルキル化反応を行った。反応時間を24時間行い、シーケンシング電気泳動を用いて解析した結果、それぞれnM濃度下での5'-TGACCA-3'における配列特異的なアルキル化を観察することができた(第4図)。

興味深いことに、14もマッチ配列である5'-TGACCA-3'でアルキル化が観察されているが、その反応性は15, 16と比べると低く、ミスマッチ配列でのアルキル化も観察されている。明らかにDu86の近傍の自由度があることがその配列認識能の低下を引き起こしている。また、N末端のアセチル基を外すことによる影響は、ほとんどなかった。15, 16のような分子設計は、Im-Py認識則に従った配列認識能を有しており、認識塩基配列をイミダゾール-ピロールの配置によって、変えることができる。このような塩基配列認識能を有しながら高いDNAアルキル化能を兼ね備えた配列特異的アルキル化剤は前例がないものである。

より実用性を重視した配列特異的アルキル化剤の分子設計

ここまで述べてきた本発明者らが開発した機能分子13, 14, 15, 16は、非常に優れた塩基配列認識能と、nM濃度で発現するDNAアルキル化能を兼ね備えた理想的な配列特異的アルキル化剤である。その上、イミダゾール-ピロールの配置を変えることで、認識配列を変えることも可能にしている。しかしながら、これらの化合物は何れもDNAアルキル化部分に天然物であるデュオカルマイシンB₂由来のセグメントAを使用しているので大量生産という点で若干問題が残る。

この点については、本発明者らは、既にBogerらによって合成法が報告されている(J. Org. Chem. 1992, 57, 2873; J. Org. Chem. 1995, 60, 1271 等)、CBI: 1, 2, 9, 9a-テトラヒドロシクロプロパ[c]ベンズ[e]インドール-4-オン(22)をDu86の代わりに使用することでこの問題が解決できると考えた。CBIを使う上での利点として1, 3-ジヒドロキシナフタレンという市販品を出発原料として用いることができる点、また両エナンチオマーも光学分割によって供給可能になる点などが挙げられる。そこで、本発明者らは、16のDu86部をCBIに置き換えた化合物23を新しく合成した。そしてそのDNAアルキル化能評価を長鎖DNA(pUC-I I)を用いて行った。結果を第5図に示す。

その結果、CBIはDu86のセグメントAと比べても遜色なく配列特異的に

アルキル化を行うことができることを見い出した。このC B Iへの変換は、本発明者らが開発してきた配列特異的アルキル化剤に適用可能であると考えられる。

本発明者らのこの新しい発見は、既存のI m-P yヘアピンポリアミドとC B Iをビニルリンカーで結合させたことである。このビニルリンカーでの結合による分子設計の最適化が、配列特異的アルキル化剤実現の重要な因子であった。この発見によって、本発明者らが開発した配列特異的アルキル化剤の実用化、汎用化の可能性が一段と大きくなった。

塩基配列特異的アルキル化剤としてのP y-I mポリアミドの応用例

(i) 遺伝子発現制御ツールとしての可能性—新しいジーンノックアウト法の開発に向けて

特定の遺伝子の発現を人為的にコントロールする方法としては、遺伝子の転写産物であるmRNAに対する相補的なDNA誘導体を投与し、タンパク質への翻訳を阻害するアンチセンス法や、mRNAを配列選択的に切断するリボザイム法などがあり、前者はHIV患者に対するサイトメガロウイルスに対する点眼薬として既に実用化されている。遺伝子の転写の段階を抑える方法としてはオリゴヌクレオチド誘導体を標的とする2本鎖DNAに三重鎖を形成させるアンチジーン法が提案されており、米国ではベンチャービジネスも数社設立された。しかし、この方法はターゲットとなる塩基配列がAとGの連続した部分に限られていることや、またオリゴヌクレオチドの核への透過の困難さから、実用化の段階には達していない。

これに比べ、P y-I mポリアミドは標的となる塩基配列を自由に選択でき、更に細胞膜や核膜の透過性も非常にすぐれているため、遺伝子の発現をコントロールする分子として大きく発展する可能性を秘めている。実際、Dervanらによってピロール(P y)-イミダゾール(I m)ポリアミドを用いて遺伝子の発現の制御の報告がなされている。しかしながら、Dervanらの遺伝子発現の制御は転写因子の結合を阻害することによって行われるため、ポリアミドが結合するターゲット配列は限られているのが現状である。アルキル化能をもつP y-I mポリアミドはDNAに配列特異的に結合するので、特定の遺伝子の発現を

制御領域のみでなく、蛋白をコードしている領域でも効果的に制御することが可能であると考えられる。従ってこれらの分子は、ポストゲノム時代に必要とされているノックアウトジーン法として未知遺伝子の機能解析や、更にはテーラーメード医薬としてもさまざまな利用が考えられる。アルキル化能をもつ P y - I m ポリアミドは DNA に配列特異的に共有結合するので、特定遺伝子のタンパクの発現をコードする領域でも効果的に制御することが可能であると考えられる（第 6 図）。このことはターゲットが似ている配列が多い調節領域にとどまらず、任意の配列をターゲットに選べることを意味している。

この利点は、病気の分子生物学的知見に基づいた新しい抗がん剤として有望であると考えられる。即ち抗がん剤として細胞において重要な役割を果たしていることが知られている遺伝子、例えば r a s オンコジーン、細胞周期を調節する E 2 F 遺伝子、テロメア領域やテロメアーゼ遺伝子などをターゲットとする方法があげられる。

現在、まだ初期的な実験として、T 7 プロモーターと T 7 ポリメラーゼを用い、G F P プロテイン発現コード領域を使った実験を進めているが、そのコード領域中の 3 8 7 n t 位のアデニンに対する化合物 1 3 の配列特異的なアルキル化に由来したポリメラーゼの転写阻害から生成した m R N A を観察することができている（第 7 図）。まだ、実験条件が整っていない段階であり、更に詳細な転写阻害機構を解析していく必要がある。しかしながら、この結果は、配列特異的アルキル化剤がコード領域中で特異的に転写を阻害する能力を有していたことを世界で初めて示した実験であり、その意義は大きいと考えられる。新しいノックアウトジーン法の開発に向けてのブレイクスルーになるものである。

(ii) 配列特異的アルキル化剤が抗細胞増殖阻害活性に与える効果

..... テーラーメード抗がん剤の開発に向けて

本発明者らが合成した多くの配列特異的アルキル化能をもつ P y - I m ポリアミドについて 3 9 種類のヒト培養がん細胞に対する抗細胞活性を検討した結果（3 9 種類のヒト培養がん細胞に対する抗細胞活性評価は、全て(財)癌研究会癌化学療法センター、矢守隆夫氏に依頼した。）、いくつか興味深い事実が明らかになってきた。ひとつは、DNA アルキル化能と抗細胞活性の間に比例関係がみ

られたことである（第8図）。例えば、平均 IC_{50} 値はそれぞれ $ImPyDu$ （-4.59）、 $ImPyDu86$ （-5.95）、 $ImPyLDu86$ （-8.25）のようにDNAアルキル化能の増大に伴い、小さくなっていく。特に、ビニルリンカーをイミダゾール-ピロールポリアミドと $Du86$ の間に配置したことによる劇的な抗細胞活性の向上が、同系列の配列特異的アルキル化剤（ $PyPyLDu86$ 、 $PyPyPyLDu86$ 、 $ImPyPyLDu86$ ）でも観察されていることは特筆すべき事実である。

更に興味深い結果が、ヘアピン型配列特異的アルキル化剤、 $ImPyPy\gamma-ImPyLDu36$ （13）と $ImPyPy\gamma\gamma-ImPyPyLDu36$ （14）の場合について抗細胞活性を示すフィンガープリントパターンを比較したときに得られた（第9図）。一般に、作用機序が類似した薬剤間でフィンガープリントパターンを比較した場合、高い相関係数（ $r=0.75\sim 1.0$ ）が得られてくることが知られており、実際、DNAインターカレーター、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン間では非常に高い類似性が見られる。しかし、13と14は、同じDNAマイナーグループでアデニン、グアニンのN3位をアルキル化する反応機序であるにもかかわらず、両者のフィンガープリントパターンの相関性はかなり低いものであった（ $r=0.60$ ）。この13と14のように、構造が類似していながら塩基配列認識能の違いだけで、抗細胞活性に影響を与えられたことは、これまで前例がなく、非常に重要な知見になった。これらの結果はアルキル化剤に配列選択性を付与することで抗細胞増殖阻害活性を変えることが可能であることを意味しており、新しい抗ガン剤や遺伝子治療薬への道を拓くものであることを示唆している。

DNAアルキル化剤は第一世代の抗がん剤と言われマイトマイシン、シスプラチン、ナイトロジェンマスタード、サイクロフォスファミドなど様々な薬物が開発され、現在でも臨床で用いられている。しかし、正常細胞に対する重い副作用など克服が難しい問題があり、開発はその後頭打ちになっている。そのため、メトトキセートや5-フルオロウラシルなどの代謝拮抗剤や、カンプトテシンなどのトポイソメラーゼの阻害剤、タキソールなどのチューブリンをターゲットとするDNA以外を標的とした抗がん剤の開発が主流になっている。DNAアルキル化

剤にDNAの塩基配列特異性を付与することによって、特定の遺伝子の発現を選択的にコントロールすることにより、副作用のないテーラーメイド抗がん剤を開発する糸口になると考えられる。

なお、特願2002-063608明細書に記載された内容を、本明細書にすべて取り込む。

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例1 5'-テキサスレッドラベルした450塩基対DNAの合成

DNAフラグメント(pUC-I')は、5'-テキサスレッドでラベルした20塩基対プライマー：5'-AGAATCAGGGGATAACGCAG-3' (pUC18 forward, 780-799)、20塩基対プライマー：5'-TTACCACTGGCTGCTGCCAG-3' (pUC18 reverse, 1459-1478)を用いてpUC18を鋳型としてPCR法によって合成した。得られたDNAフラグメントはSuprec-02にてろ過精製した後、UV吸収を測定してその濃度を決定した。

DNAフラグメント(pUC-II)は、5'-テキサスレッドでラベルした21塩基対プライマー：5'-TGCTGGCCTTTTGCTCACATG-3' (pUC18 reverse, 1861-1881)、18塩基対プライマー：5'-TGTAACAACGACGGCCAGT-3' (pUC18 forward, 378-395)を用いてpUC18を鋳型としてPCR法によって合成した。得られたDNAフラグメントはSuprec-02にてろ過精製した後、UV吸収を測定してその濃度を決定した。

実施例2 ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた解析

全量10 μ lのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)5mM中に5'末端がテ

キサスレッドでラベルされたDNAフラグメント (pUC-I') 10 nM、DMF 10% (v/v) と第1図に表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (エッペンドルフ) に入れて23℃下で24時間静置した。

[レーン1-4, 100, 50, 25, 12.5 nM (1); レーン5-8, 100, 50, 25, 12.5 nM (12); レーン9-12, 100, 50, 25, 12.5 nM (13); レーン13-16, 100, 50, 25, 12.5 nM (14); レーン17, DNAコントロール]

子牛胸腺DNA (1 mM, 1 μ L) を加えクエンチングを行い、90℃にて5分間振動させた。遠心減圧下得られたDNAにローディング色素 (フューシンレッドのDMF溶液) 8 μ Lを加え溶解させた後、94℃にて20分間振動させた。直ちに0℃にて急冷した後、その2 μ Lについて、HITACHI 5500-S

DNAシーケンサーシステムを用いた6%ディネーチャーポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。結果を第1図に示す。

実施例3 ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた解析

全量10 μ Lのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 5 mM中に5'末端がテキサスレッドでラベルされたDNAフラグメント (pUC-I') 10 nM、DMF 10% (v/v) と第2図に表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (エッペンドルフ) に入れて23℃下で5分、1時間、2時間、それぞれ静置した。

[レーン1, DNAコントロール; レーン2-4, 100, 50, 25 nM (13); レーン5-7, 100, 50, 25 nM (13); レーン8-10, 100, 50, 25 nM (13); レーン11-13, 100, 50, 25 nM (1);]

各反応時間後、子牛胸腺DNA (1 mM, 1 μ L) を加えクエンチングを行い、90℃にて5分間振動させた。遠心減圧下得られたDNAにローディング色素 (フューシンレッドのDMF溶液) 8 μ Lを加え溶解させた後、94℃にて20分間振動させた。直ちに0℃にて急冷した後、その2 μ Lについて、HITACHI 5500-S DNAシーケンサーシステムを用いた6%ディネーチャーポ

リアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。結果を第2図に示す。

実施例4 DNAオリゴマーに対するアルキル化反応の解析

DNAオリゴマーはDNA合成機で合成したものを用いた。全量50 μ lのカ
コジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)50mM中に二本鎖DNAフラグメン
ト150 μ M、DMF10%(v/v)とそれぞれの試薬1, 12, 13, 又は
14(150 μ M)を含む標準反応溶液を微量遠心分離管(エッペンドルフ)に
入れて23℃下で静置した

反応の進行をケムコボンド 5-ODS-H カラム(4.6 \times 150mm)を
用いてHPLCにて測定した。HPLC条件を以下に表記する。

[50mMギ酸アンモニウム及び0-50%アセトニトリル リニアグラジエント
(0-40min)、流速:1.0mL/min、254nm]

結果を第3図に示す。

実施例5 ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた解析

全量10 μ lのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)5mM中に5'末端がテ
キサスレッドでラベルされたDNAフラグメント(pUC-I I)10nM、D
MF10%(v/v)と第4図に表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量
遠心分離管(エッペンドルフ)に入れて23℃下で24時間静置した。

[レーン1, DNAコントロール; レーン2-7, 50, 25, 12.5, 1
0, 7.5, 5, 2.5nM(15); レーン8-13, 50, 25, 12.5,
10, 7.5, 5, 2.5nM(16); レーン14-19, 50, 25, 12.
5, 10, 7.5, 5, 2.5nM(14)]

子牛胸腺DNA(1mM, 1 μ L)を加えクエンチングを行い、90℃にて5
分間振動させた。遠心減圧下得られたDNAにローディング色素(フューシンレ
ッドのDMF溶液)8 μ lを加え溶解させた後、94℃にて20分間振動させた。
直ちに0℃にて急冷した後、その2 μ lについて、HITACHI 5500-S
DNAシーケンサーシステムを用いた6%ディネーチャーポリアクリルアミドゲ
ルでの電気泳動を行った。結果を第4図に示す。

実施例 6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた解析

全量 $10\ \mu\text{l}$ のリン酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) $5\ \text{mM}$ 中に $5'$ 末端がテキサスレッドでラベルされた DNA フラグメント (pUC-I I) $10\ \text{nM}$ 、DMF 10% (v/v) と第 5 図に表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (エッペンドルフ) に入れて 23°C 下で 24 時間静置した。

[レーン 1-5, $50, 25, 12.5, 6.3\ \text{nM}$ (16) ; レーン 6-10, $50, 25, 12.5, 6.3\ \text{nM}$ (23)]

子牛胸腺 DNA ($1\ \text{mM}$, $1\ \mu\text{L}$) を加えクエンチングを行い、 90°C にて 5 分間振動させた。遠心減圧下得られた DNA にローディング色素 (フューシンレッドの DMF 溶液) $8\ \mu\text{l}$ を加え溶解させた後、 94°C にて 20 分間振動させた。直ちに 0°C にて急冷した後、その $2\ \mu\text{l}$ について、HITACHI 5500-S DNA シーケンサーシステムを用いた 6% ディネーチャーポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。結果を第 5 図に示す。

実施例 7 ~ 9 化合物 12, 13 及び 14 の合成

反応スキーム 1 に従って、化合物 12, 13 及び 14 を合成した。

(1) AcImPyPy- γ - CO_2CH_3 (4) の合成

化合物 2 ($1.0\ \text{g}$, $3.72\ \text{mmol}$) のメタノール-酢酸エチル混合溶液 ($1:1$, $30\ \text{mL}$) に 10% パラジウム-炭素 ($220\ \text{mg}$) を加え、水素雰囲気下、室温にて 3 時間攪拌した。触媒成分をセライトろ過により除去した後、ろ液を濃縮してクルードのアミン体を得て ($859\ \text{mg}$)、更なる精製をすることなく、これを次の反応に用いた。クルードのアミン体 ($859\ \text{mg}$, $3.59\ \text{mmol}$) を $15\ \text{mL}$ の DMF に溶かし、化合物 3 ($820\ \text{mg}$, $2.69\ \text{mmol}$) と FDPP : ペンタフルオロフェニルジフェニルフォスフィネート ($1.70\ \text{g}$, $4.42\ \text{mmol}$) を加え、続いて Pr_2NEt : ジイソプロピルエチルアミン ($1.54\ \text{mL}$, $8.84\ \text{mmol}$) を添加した。反応混合物を室温にて 24 時間攪拌した後、反応溶液の溶媒を留去して得た残留物をシリカゲルカラ

ムクロマトグラフィー（0-10% MeOH/CHCl₃、グラジエント溶離）にて精製することにより化合物4（1.33g）を収率94%で得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.23 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.02 (brt, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.27 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 7.17 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 7.12 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 6.87 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.16 (dt, J= 6.0, 7.0 Hz, 2H), 2.34 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.74 (qu, J= 7.0 Hz, 2H)。

ESMS m/e calcd for C₂₄H₃₁N₃O₆ (M+H) 527.2, found 527.1。

(2) AcImPyPy-γ-CO₂H (5) の合成

化合物4（1.33g, 2.52mmol）を蒸留水50mlで懸濁し、水酸化ナトリウム（800mg, 20mmol）を加えた。これを室温にて24時間攪拌したのち、10% HCl水溶液を0℃下で加えて酸性（pH2）にした。生じた沈殿物をろ取り、水洗してから乾燥し、化合物5（1.10g）を収率85%で得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.24 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.02 (brt, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.26 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 7.17 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 7.11 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 6.86 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.17 (dt, J= 6.0, 7.0 Hz, 2H), 2.24 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.79 (qu, J= 7.0 Hz, 2H)。

ESMS m/e calcd for C₂₃H₂₉N₃O₆ (M+H) 513.2, found 513.3。

(3) NO₂ImPyPyLCO₂CH₂CH₃ (8c) の合成

化合物6（500mg, 2.23mmol）のメタノール-酢酸エチル混合溶液（1:1, 20mL）に10%パラジウム-炭素（200mg）を加えた。更に水素化ほう素ナトリウム（170mg, 4.47mmol）を蒸留水（1ml）で懸濁したものを、0℃下で滴下した後、反応混合物を窒素雰囲気下、室温にて20分間攪拌した。触媒成分をシリカゲルろ過にて除去した後、ろ液を濃縮してクルードのアミン体を得て（418mg）、更なる精製をすることなく、こ

れを次の反応に用いた。クルードのアミン体 (418 mg, 2.15 mmol) を 14 mL の DMF に溶かし、化合物 7 (330 mg, 1.13 mmol) と FDPP : ペンタフルオロフェニルジフェニルフォスフィネート (1.3 g, 3.39 mmol) を加え、続いて $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$: ジイソプロピルエチルアミン (1.18 mL, 6.78 mmol) を添加した。反応混合物を 20 時間攪拌した後、反応溶液の溶媒を留去して得た残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0-10% MeOH/CHCl₃、グラジエント溶離) にて精製することにより化合物 8c (359 mg) を収率 83% で得た。

^1H NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.86 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.07 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 4.14 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 1.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H)。

ESMS *m/e* calcd for C₂₁H₂₄N₇O₆ (M+H) 470.2, found 470.1。

(4) AcImPyPy- γ -ImPyPyCO₂CH₃ (9a) の合成

化合物 8a (200 mg, 0.466 mmol) のメタノール-酢酸エチル混合溶液 (1:1, 8 mL) に 10% パラジウム-炭素 (100 mg) を加え、水素雰囲気下、室温にて 5 時間攪拌した。触媒成分をセライトろ過により除去した後、ろ液を濃縮してクルードのアミン体を得て (178 mg)、更なる精製をすることなく、これを次の反応に用いた。クルードのアミン体 (178 mg, 0.466 mmol) を 2 mL の DMF に溶かし、化合物 5 (190 mg, 0.373 mmol) と FDPP : ペンタフルオロフェニルジフェニルフォスフィネート (268 mg, 0.699 mmol) を加え、続いて $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$: ジイソプロピルエチルアミン (0.243 mL, 1.39 mmol) を添加した。反応混合物を室温にて 16 時間攪拌した後、反応溶液の溶媒を留去して得た残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0-10% MeOH/CHCl₃、グラジエント溶離) にて精製することにより化合物 9a (154.5 mg) を収率 49% で得た。

^1H NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.26 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.99 (s,

1H), 9.96 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.02 (brt, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.42 (s, 2H), 7.26 (s, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 3.94 (s, 6H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.20 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.78 (m, 2H)。

ESMS m/e calcd for $C_{41}H_{48}N_{15}O_9$ (M+H) 894.4, found 894.3。

(5) AcImPyPy- γ -ImPyLCO₂CH₂CH₃ (9b) の合成

化合物 8b (68 mg, 0.20 mmol) のメタノール-酢酸エチル混合溶液 (1:1, 4 mL) に 10% パラジウム-炭素 (30 mg) を加えた。更に水素化ホウ素ナトリウム (20 mg, 0.528 mmol) を蒸留水 (0.2 mL) で懸濁したものを、0℃下で滴下した後、反応混合物を窒素雰囲気下、室温にて 20 分間攪拌した。触媒成分をシリカゲルろ過にて除去した後、ろ液を濃縮してクルードのアミン体を得て (60 mg)、更なる精製をすることなく、これを次の反応に用いた。クルードのアミン体 (60 mg, 0.189 mmol) を 0.6 mL の DMF に溶かし、化合物 5 (97 mg, 0.189 mmol) と FDP P: ペンタフルオロフェニルジフェニルフォスフィネート (109 mg, 0.284 mmol) を加え、続いて iPr_2NEt : ジイソプロピルエチルアミン (99 μ L, 0.568 mmol) を添加した。反応混合物を 18 時間攪拌した後、反応溶液の溶媒を留去して得た残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0-10% MeOH/CHCl₃, グラジエント溶離) にて精製することにより化合物 9b (107 mg) を収率 69% で得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.27 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.89 (s, 2H), 8.01 (brt, 1H), 7.51 (d, J= 16.0 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.43 (d, J= 1.0 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.27 (d, J= 1.0 Hz, 1H), 7.17 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 7.12 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 6.89 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 6.83 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 6.11 (d, J= 16.0 Hz, 1H), 4.15 (q, J= 7.0 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.20 (dt, J= 5.5, 7.0 Hz, 2H), 2.36 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.79

(q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)。

ESMS m/e calcd for $C_{38}H_{46}N_{13}O_8$ (M+H) 812.4, found 812.3。

なお、上記 (3) において原料として用いた化合物 7 及び 8、及び上記 (4) において原料として用いた化合物 8 a、並びに上記 (5) において原料として用いた化合物 8 b は、J. Am Chem. Soc. 1999, 121, 4961 及び J. Am Chem. Soc. 2000, 122, 1602 等に記載の方法により合成したものを使用した。

(6) AcImPyPy- γ -ImPyPyLCO₂CH₂CH₃ (9 c) の合成
化合物 9 c は、化合物 9 b と同様の合成手順により収率 28% で得られた。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.26 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.02 (brt, 1H), 7.52 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.27 (s, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.08 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 4.15 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.21 (m, 2H), 2.36 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.79 (m, 2H), 1.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)。

ESMS m/e calcd for $C_{44}H_{52}N_{15}O_9$ (M+H) 934.4, found 934.4。

(7) AcImPyPy- γ -ImPyPyCO₂H (10 a) の合成

化合物 9 a (154.5 mg, 0.181 mmol) を 0.6 ml の蒸留水で懸濁したものに、1, 8-ジアザビシクロ [5.4.0] -7-ウンデセン (DBU) (0.2 ml, 1.34 mmol) を添加した。この反応混合物を 2 時間攪拌し、1% HCl 水溶液を 0℃ 下で加えて酸性 (pH 2) にした。生じた沈殿物をろ取し、水洗した後、乾燥し、化合物 10 a (131.5 mg) を収率 86% で得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.25 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.02 (brt, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.41 (s, 2H), 7.26 (s, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.12 (s, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 3.94 (s, 6H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H),

3.79 (s, 3H), 3.18 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.78 (m, 2H)。

ESMS m/e calcd for $C_{40}H_{46}N_{15}O_9$ (M+H) 880.4, found 880.4。

(8) AcImPyPy- γ -ImPyLCO₂H (10b) の合成

化合物 9b (143mg, 0.176mmol) を 0.6ml の蒸留水で懸濁したものに、DBU (0.6ml, 4.01mmol) を添加した。この反応混合物を 6 時間攪拌した後、溶媒を留去して得た残留物をジエチルエーテルと酢酸エチルを用いて洗浄した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0-20% MeOH/CHCl₃, グラジエント溶離) にて精製した後、粗結晶のカルボン酸塩を 1% 酢酸で酸性にさせた。生じた沈殿物をろ取、水洗、乾燥して化合物 10b (70mg) を収率 51% で得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.27 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.89 (s, 2H), 8.02 (brt, 1H), 7.46 (d, J= 16.0 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.27 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.13 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 6.89 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 6.80 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 6.03 (d, J= 16.0 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.21 (m, 2H), 2.36 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.79 (m, 2H)。

ESMS m/e calcd for $C_{36}H_{42}N_{13}O_8$ (M+H) 784.3, found 784.3。

(9) AcImPyPy- γ -ImPyPyLCO₂H (10c) の合成

化合物 10c は、化合物 9b の代わりに化合物 9c を用い、化合物 10b と同様の合成手順により収率 50% で得られた。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.24 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.01 (brt, 1H), 7.45 (d, J= 16.0 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.26 (s, 2H), 7.16 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.99 (d, J= 16.0 Hz, 1H), 3.94 (s, 6H), 3.84 (s, 6H), 3.79 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.20 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.78 (m, 2H)。

ESMS m/e calcd for $C_{42}H_{48}N_{15}O_9$ (M+H) 906.4, found 906.3.

(10) AcImPyPy- γ -ImPyPyCOIm (11a) の合成

化合物 10a (10 mg, 11.3 μ mol) を DMF (0.2 ml) で溶かしたものに、1, 1'-カルボニルジイミダゾール (3.5 mg, 22.0 μ mol) を加えた。この反応混合物を室温にて 5 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去して得た黄色残留物をジエチルエーテル (5 ml) で 3 回洗浄して化合物 11a (10 mg) を収率 95% で得た。

1H NMR (DMSO- d_6) δ 10.25 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.01 (brt, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.26 (s, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.13 (s, 2H), 6.95 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 3.94 (s, 6H), 3.90 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.20 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.78 (m, 2H)。

ESMS m/e calcd for $C_{43}H_{48}N_{17}O_8$ (M+H) 930.4, found 930.3.

(11) AcImPyPy- γ -ImPyLCOIm (11b) の合成

化合物 11b は、化合物 10a の代わりに化合物 10b を用い、化合物 11a と同様の合成手順により収率 94% で得られた。

1H NMR (DMSO- d_6) δ 10.26 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.02 (brt, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.87 (d, $J=15.0$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.14 (d, $J=15.0$ Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.21 (m, 2H), 2.37 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.80 (m, 2H)。

ESMS m/e calcd for $C_{39}H_{44}N_{15}O_7$ (M+H) 834.4, found 834.3.

(12) AcImPyPy- γ -ImPyPyLCOIm (11c) の合成

化合物 11c は、化合物 10a の代わりに化合物 10c を用い、化合物 11a と同様の合成手順により収率 94% で得られた。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 10.24 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.01 (brt, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.13 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.20 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.79 (m, 2H)。

ESMS m/e calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{N}_{17}\text{O}_8$ ($M+H$) 956.4, found 956.5.

(13) AcImPyPy- γ -ImPyPyCPI (12) の合成

水素化ナトリウム (3.0 mg, 75 μmol , 60% ミネラルオイル懸濁液) の無水 DMF (0.1 ml) 溶液中に DU86 のセグメント A (3.7 mg, 14.5 μmol) の無水 DMF (0.1 ml) 溶液を加えた後、化合物 11a (10 mg, 10.7 μmol) の無水 DMF (0.1 ml) 溶液を 0℃ 下で添加し、反応混合物を 0℃ にて 1 時間攪拌した。そこに 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (2 mL, pH 6.86) を 0℃ 下で加えてクエンチングした後、減圧下溶媒を留去して黄色残留物を得た。この粗結晶をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (シリカゲル、0-5% MeOH/CHCl₃、グラジエント溶離) にて精製し、化合物 12 (5.7 mg) を収率 49% で得た。更なる精製をケムコボンド 5-ODS-H カラムを用いた HPLC (0.1% AcOH/CH₃CN 0-50% リニアグラジエント、35.1 min/40 min、254 nm) で行い、得られた化合物 12 を前述した DNA アルキル化反応に用いた。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 12.37 (brs, 1H), 10.25 (s, 1H), 10.22 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.01 (brt, 1H), 7.44 (s, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.25 (s, 2H), 7.16 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 4.22 (m, 1H),

4.08 (m, 1H), 3.94 (s, 6H), 3.84 (s, 6H), 3.79 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.42 (m, 1H), 3.21 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.34 (m, 2H), 2.17 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.78 (m, 2H), 1.41 (m, 1H)。

ESMS m/e calcd for $C_{54}H_{58}N_{17}O_{11}$ (M+H) 1120.4, found 1120.5.

(14) AcImPyPy- γ -ImPyLCPI (13) の合成

化合物 13 は、化合物 11a の代わりに化合物 11b を用い、化合物 12 と同様の合成手順により収率 50% で得られた。更なる精製をケムコボンド 5-ODS-H カラムを用いた HPLC (0.1% AcOH/CH₃CN 0-50% リニアグラジエント、32.9 min/40 min、254 nm) で行い、得られた化合物 13 を前述した DNA アルキル化反応に用いた。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12.18 (brs, 1H), 10.26 (s, 1H), 10.22 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.02 (brt, 1H), 7.57 (d, J=15.0 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.58 (d, J=15.0 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.95 (s, 6H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.54 (m, 1H), 3.20 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.36 (m, 2H), 2.09 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.79 (m, 2H), 1.29 (m, 1H)。

ESMS m/e calcd for $C_{50}H_{54}N_{15}O_{10}$ (M+H) 1024.4, found 1024.4.

(15) AcImPyPy- γ -ImPyPyLCPI (14) の合成

化合物 14 は、化合物 11a の代わりに化合物 11c を用い、化合物 12 と同様の合成手順により収率 51% で得られた。更なる精製をケムコボンド 5-ODS-H カラムを用いた HPLC (0.1% AcOH/CH₃CN 0-50% リニアグラジエント、36.8 min/40 min、254 nm) で行い、得られた化合物 14 を前述した DNA アルキル化反応に用いた。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12.37 (brs, 1H), 10.26 (s, 1H), 10.22 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.02 (brt,

1H), 7.58 (d, J= 15.0 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.58 (d, J= 15.0 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.54 (m, 1H), 3.19 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.38 (m, 2H), 2.09 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.80 (m, 2H), 1.29 (m, 1H).

ESMS m/e calcd for $C_{56}H_{60}N_{17}O_{11}$ (M+H) 1146.5, found 1146.5.

実施例 10～11 化合物 15 及び 16 の合成

反応スキーム 1 に記載の化合物 13 および 14 の合成方法に従って、スキーム 2 に示すように、化合物 15 及び 16 を合成した。

(1) AcImImPyPy- γ -ImPyPyLCPI (15):

1H NMR (DMSO-d₆) δ 10.30 (s, 1H), 10.27 (s, 2H), 10.24 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.90 (s, 2H), 9.31 (brs, 1H), 8.00 (brt, 1H), 7.57 (d, J= 14.5 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.27 (s, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.15 (s, 2H), 6.89 (s, 2H), 6.55 (d, J= 14.5 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 6H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.50 (m, 1H), 3.16 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.35 (m, 2H), 2.15 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.79 (m, 2H), 1.30 (m, 1H).

ESMS m/e calcd for $C_{61}H_{65}N_{20}O_{12}$ (M+H) 1269.5, found 1269.4.

(2) H-ImImPyPy- γ -ImPyPyLCPI (16):

1H NMR (DMSO-d₆) δ 12.34 (brs, 1H), 10.30 (s, 2H), 10.23 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 9.68 (s, 1H), 8.00 (brt, 1H), 7.57 (d, J= 14.5 Hz, 1H), 7.55 (s, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.44 (s, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.27 (s, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.14 (s, 2H), 7.06 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.55 (d, J= 14.5 Hz, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 4.00 (s, 6H), 3.95

(s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.45 (m, 1H), 3.15 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.35 (m, 2H), 2.17 (m, 1H), 1.78 (m, 2H), 1.30 (m, 1H)。

ESMS m/e calcd for $C_{59}H_{62}N_{19}O_{11}$ (M+H) 1212.5, found 1212.5。

実施例 12 化合物 23 の合成

最終工程で、DU-86 のセグメント A (Du86) の代わりに 1, 2, 9, 9a-テトラヒドロシクロプロパ [c] ベンズ [e] インドール-4-オンを用いた以外は反応スキーム 1 及び 2 に記載の化合物 13 ~ 16 の合成法に従って化合物 23 を合成した。

H-ImImPyPy- γ -ImPyPyLCBI (23):

1H NMR (DMSO- d_6) 10.30 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.68 (s, 1H), 7.99 (brt, 1H), 7.98 (d, J= 8.0 Hz, 1H), 7.61-6.89 (m, 17H), 6.57 (d, J= 15.0 Hz, 1H), 4.33 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.00 (s, 6H), 3.94 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.68 (m, 1H), 3.18 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 1.55 (m, 1H)。

ESMS m/e calcd for $C_{58}H_{59}N_{18}O_9$ (M+H) 1151.5, found 1151.5。

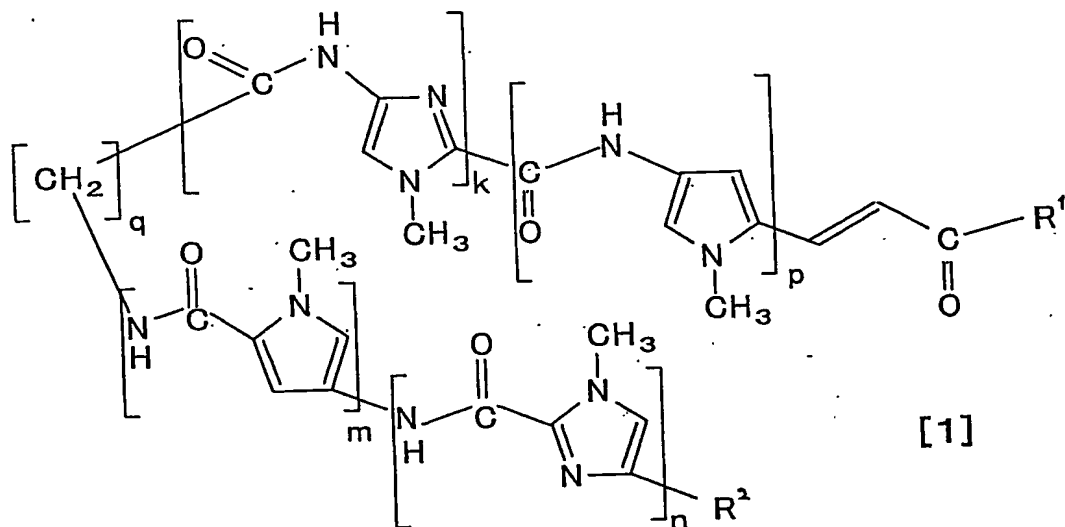
産業上の利用可能性

本発明はDNA上に存在する特定の塩基配列に対して、高いDNAアルキル化能と配列認識能を兼ね備えた機能分子の設計に関するものである。この機能分子は、分子内のイミダゾール-ピロールの配置を変えることで、塩基配列認識能を変えることが可能である。このような特性を備えたアルキル化剤は本発明者らが開発したアルキル化剤の他には例がない。このことはヒトゲノム上での重要な遺伝子配列、或いはがんなどの病気に由来した遺伝子異常に対する有用なドラッグとして、はじめてのポストゲノム時代を担う遺伝子レベルでの創薬を実現するものである。

請 求 の 範 囲

1. ピロールーイミダゾールポリアミドの末端にビニールリンカーを介してアルキル化反応部位を有するヘアピン型ポリアミド。

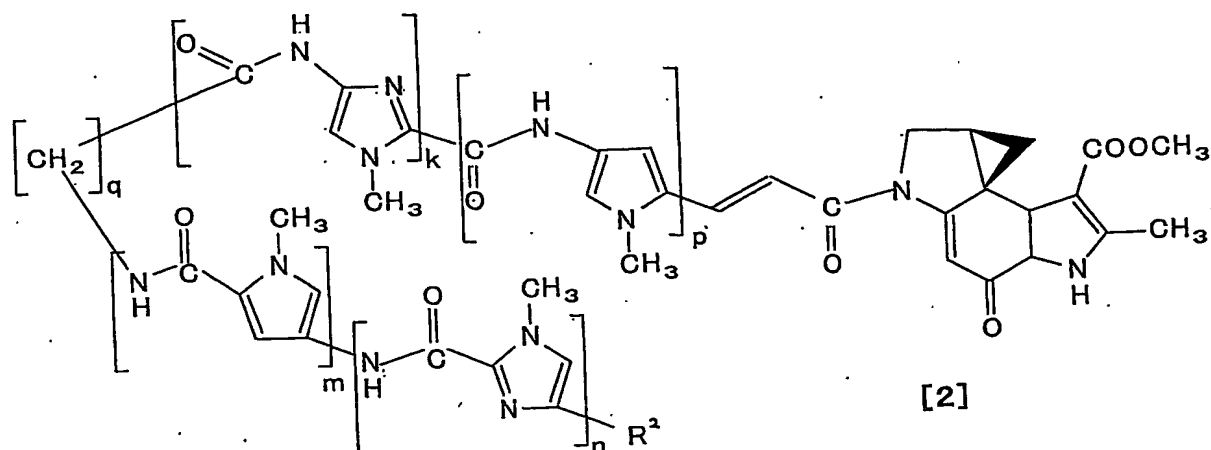
2. ヘアピン型ポリアミドが下記一般式〔1〕



(式中、 R^1 はアルキル化反応部位を表し、 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセトアミド基を表し、 k 、 p 、 q 、 m 及び n はそれぞれ独立して自然数を表す。)

で示される化合物である請求の範囲第1項に記載のヘアピン型ポリアミド。

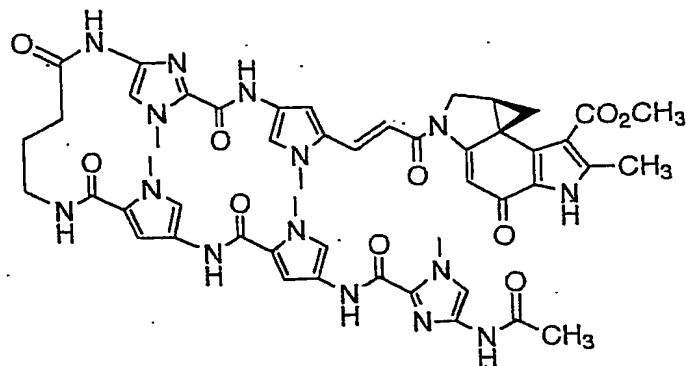
3. 一般式〔1〕で示される化合物が、下記一般式〔2〕



(式中、 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセトアミド基を表し、 k , p , m 及び n はそれぞれ独立して自然数を表す。)

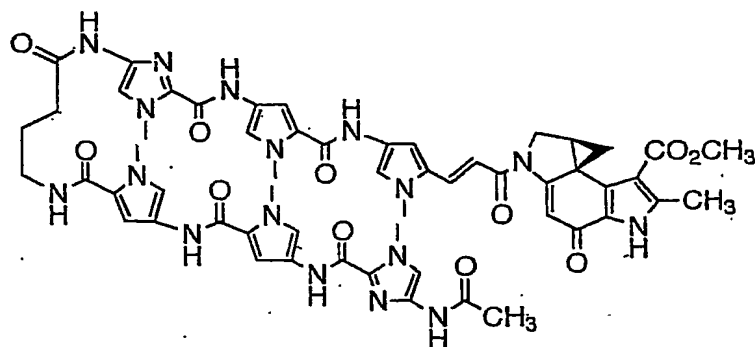
で示される化合物である請求の範囲第2項に記載のヘアピン型ポリアミド。

4. 一般式〔2〕で示される化合物が下記構造式



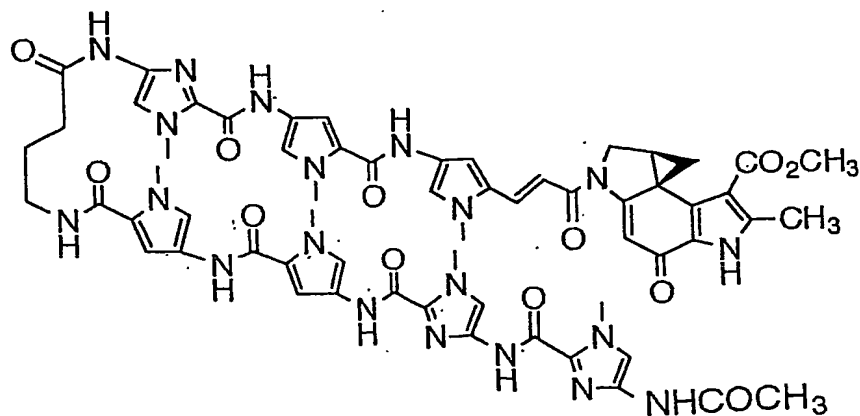
で示される化合物である請求の範囲第3項に記載のヘアピン型ポリアミド。

5. 一般式〔2〕で示される化合物が下記構造式



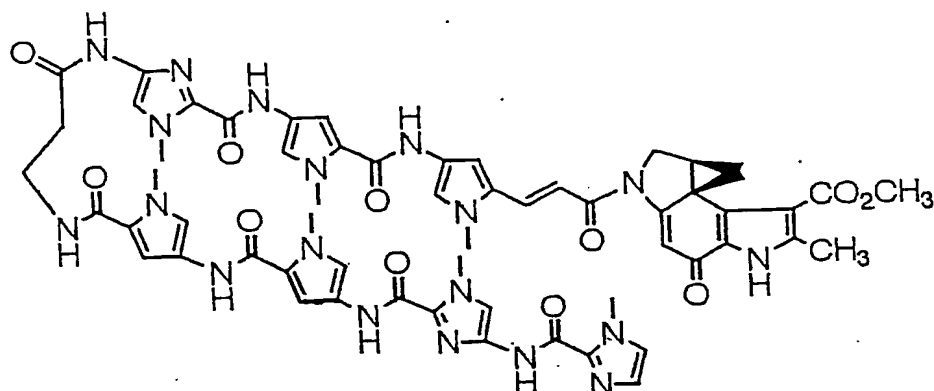
で示される化合物である請求の範囲第3項に記載のヘアピン型ポリアミド。

6. 一般式〔2〕で示される化合物が下記構造式



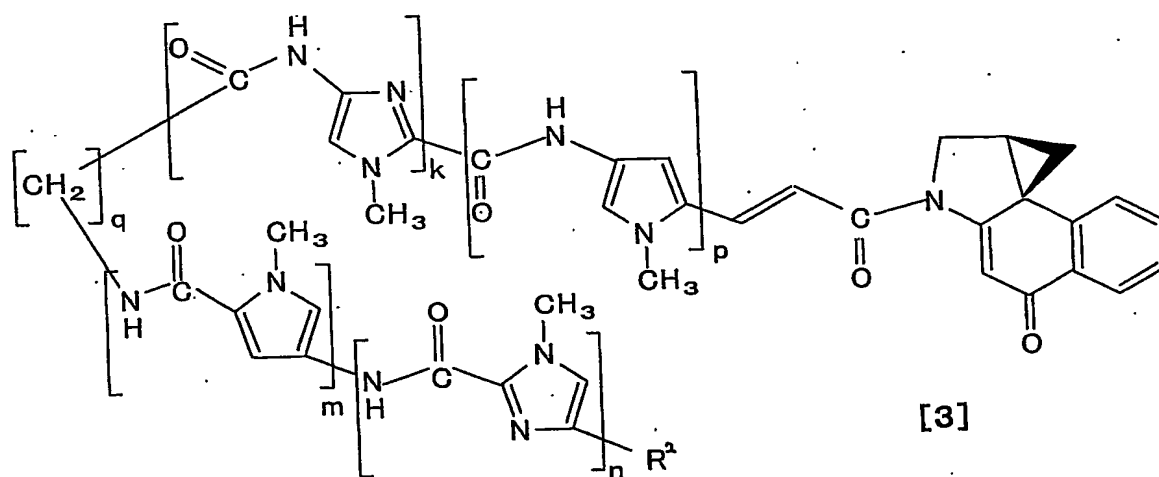
で示される化合物である請求の範囲第 3 項に記載のヘアピン型ポリアミド。

7. 一般式〔2〕で示される化合物が下記構造式



で示される化合物である請求の範囲第 3 項に記載のヘアピン型ポリアミド。

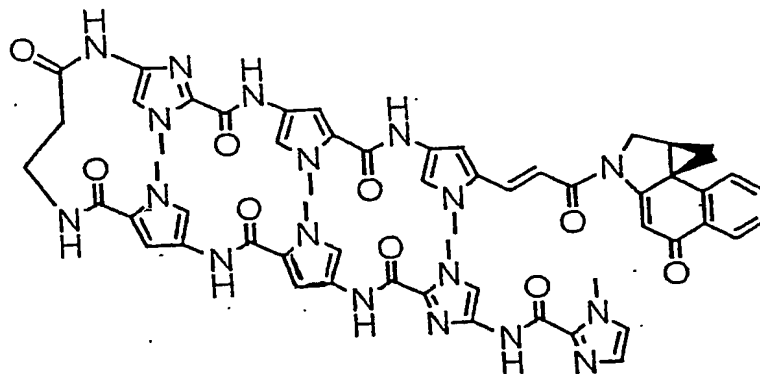
8. 一般式〔1〕で示される化合物が、下記一般式〔3〕



(式中、 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセトアミド基を表し、 k , p , q , m 及び n はそれぞれ独立して自然数を表す。)

で示される化合物である請求の範囲第 2 項に記載のヘアピン型ポリアミド。

9. 一般式〔3〕で示される化合物が下記構造式



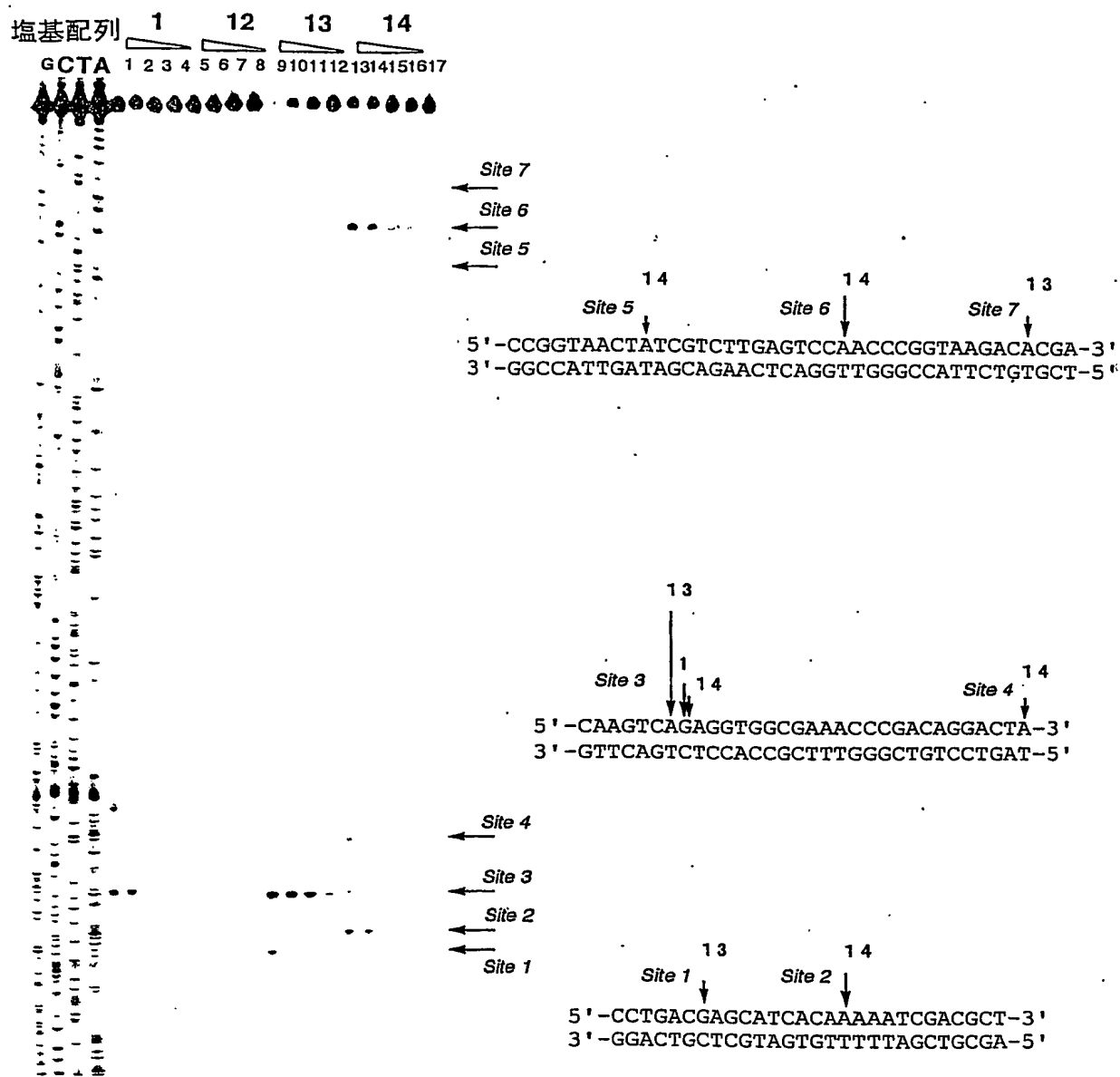
で示される化合物である請求の範囲第8項に記載のヘアピン型ポリアミド。

10. 請求の範囲第1項～第9項の何れかに記載のヘアピン型ポリアミドを含んでなる、特定遺伝子の発現を抑制する薬剤。

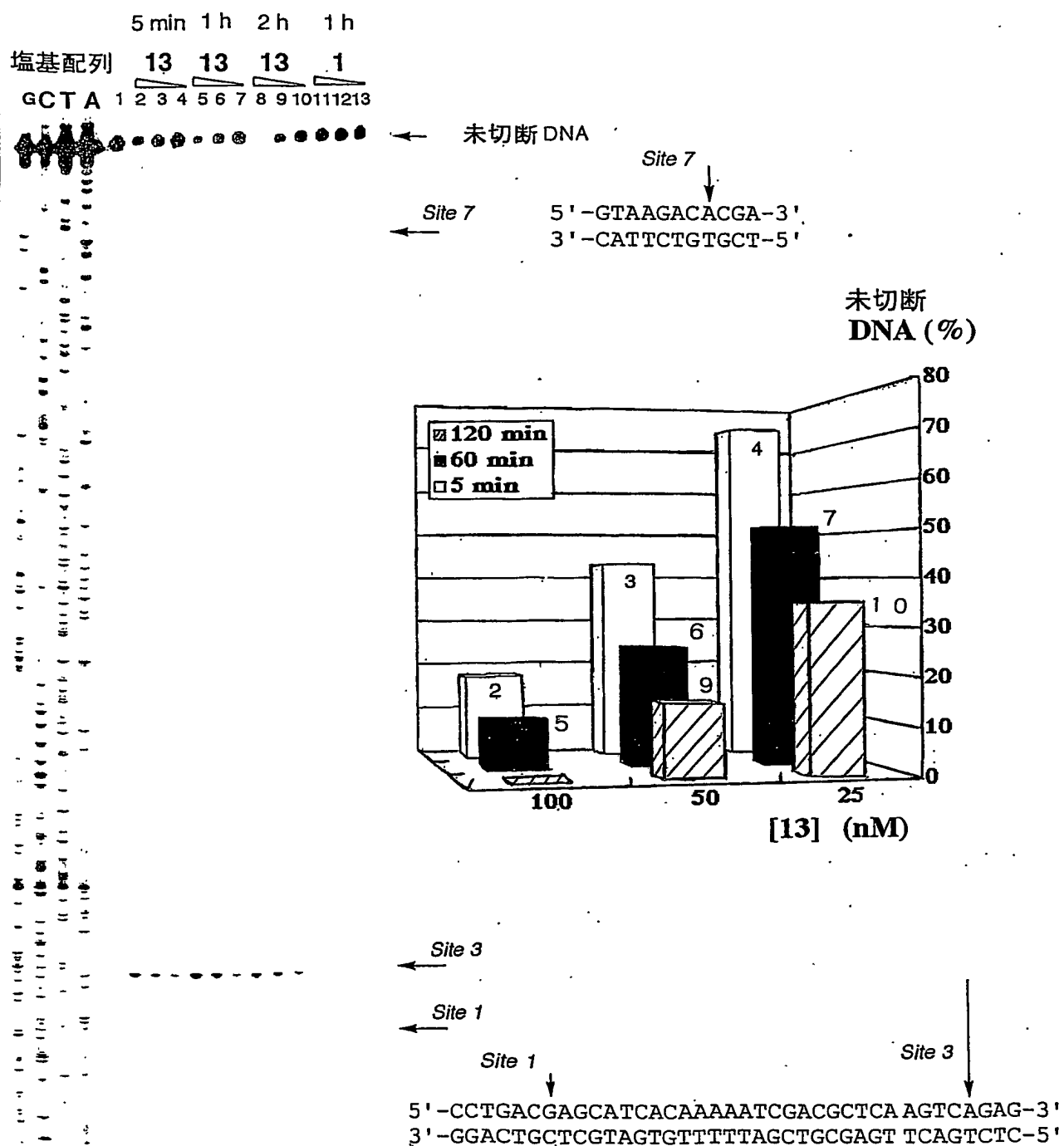
11. 特定遺伝子が異常遺伝子である請求の範囲第10項に記載の薬剤。

12. 請求の範囲第1項～第9項の何れかに記載のヘアピン型ポリアミドを含んでなる、抗ガン性を有する薬剤。

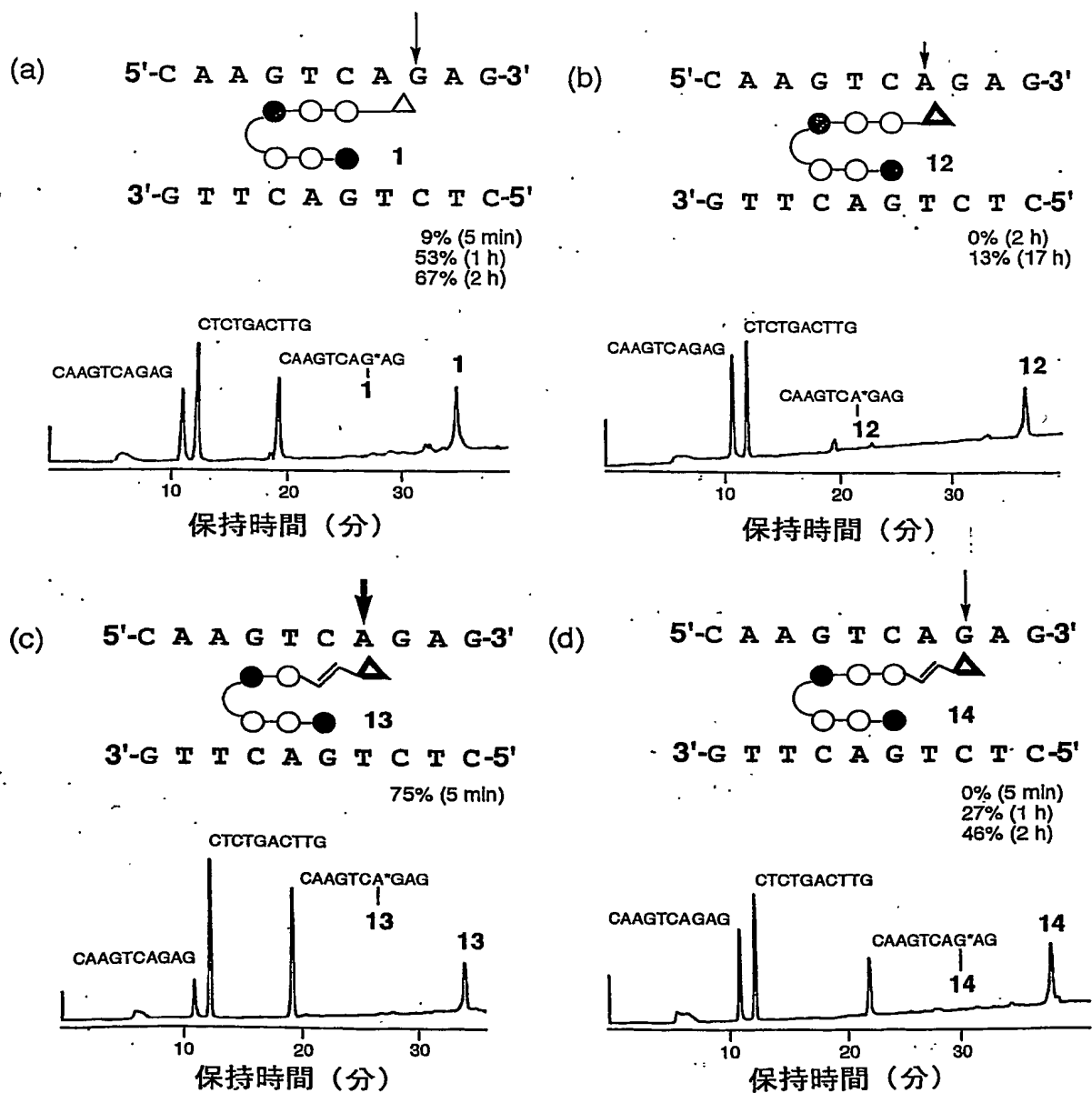
第 1 図



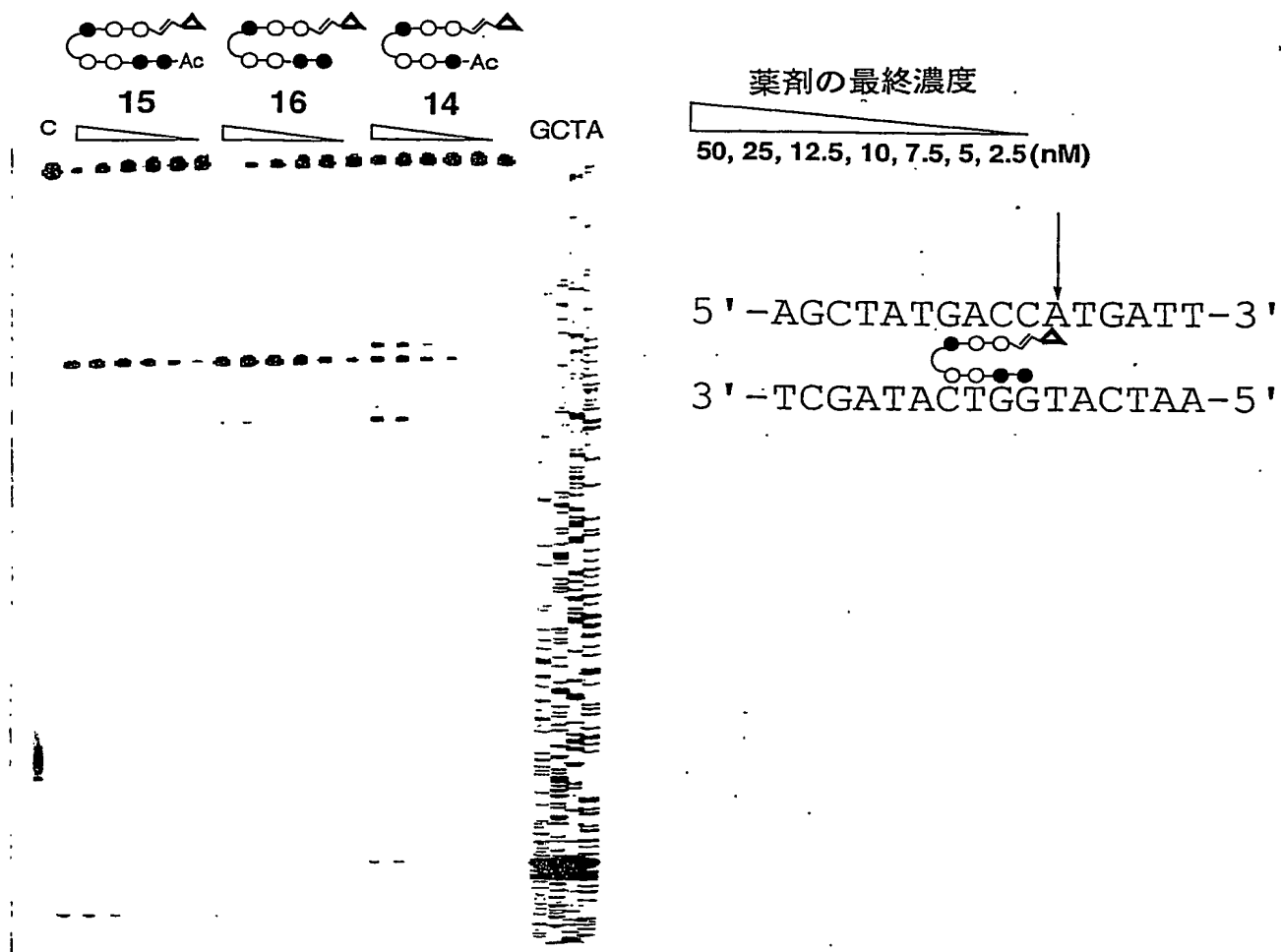
第 2 図



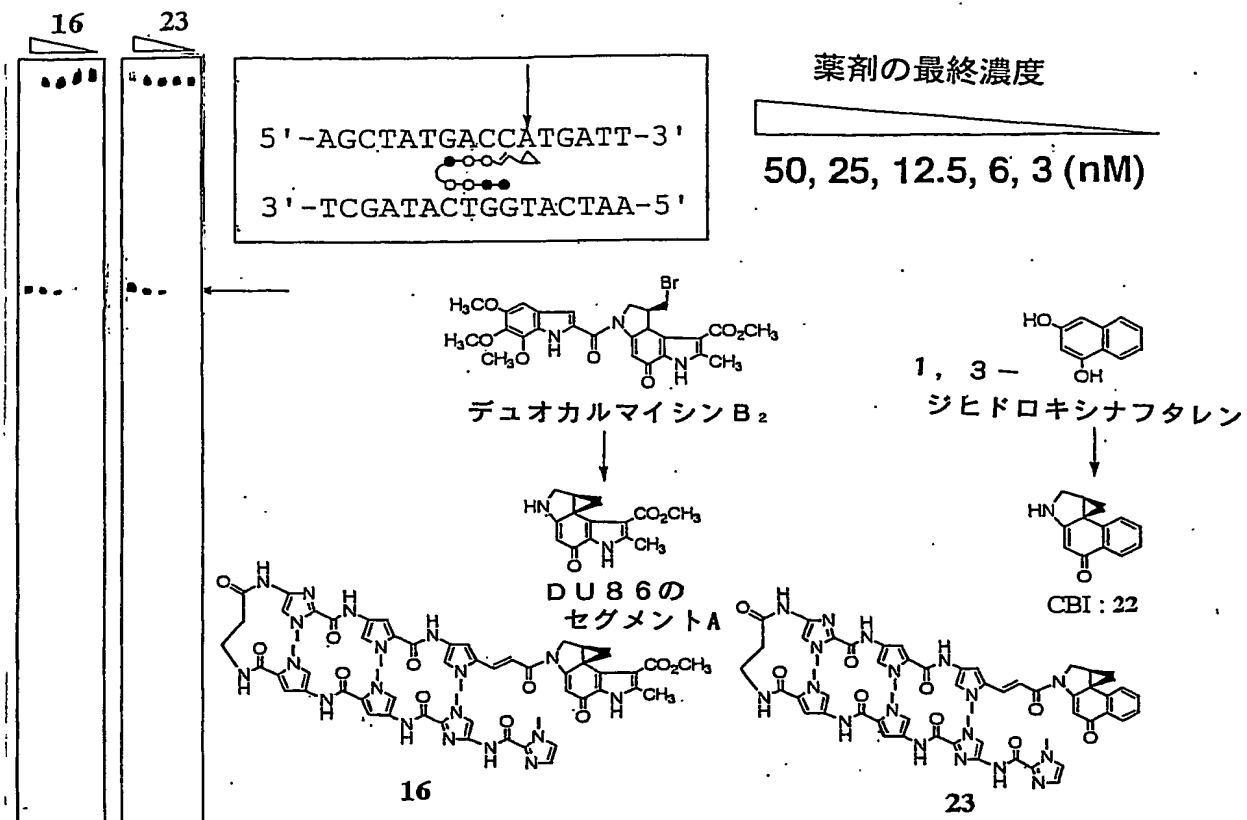
第 3 図



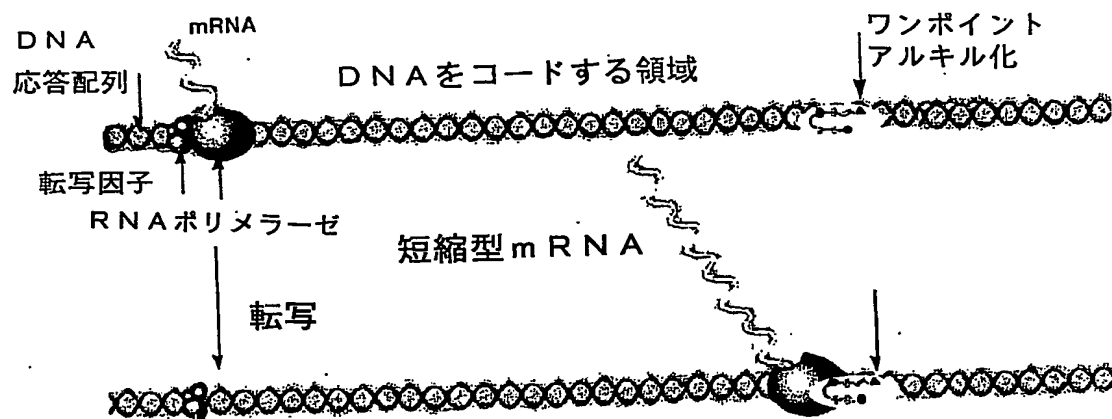
第 4 図



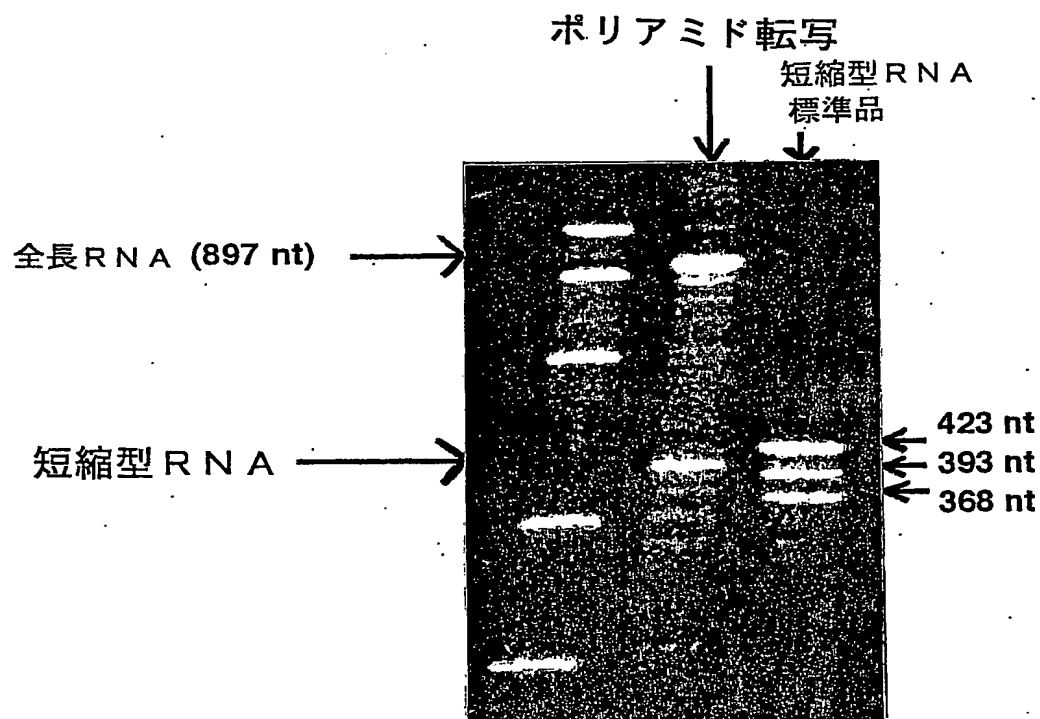
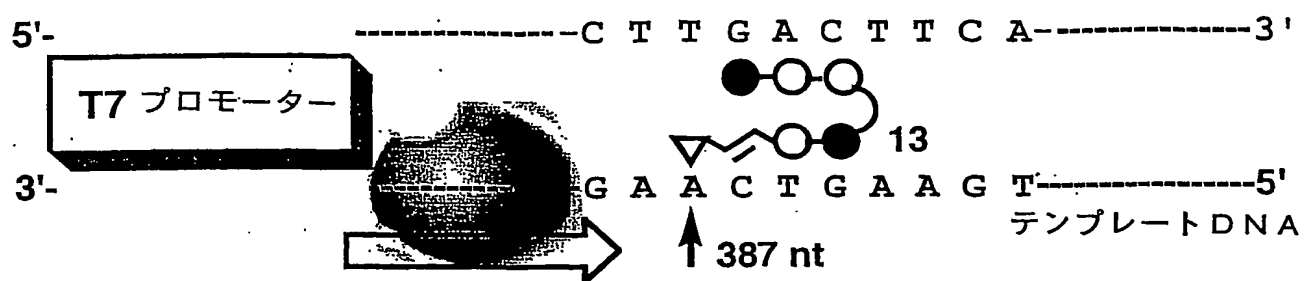
第 5 図



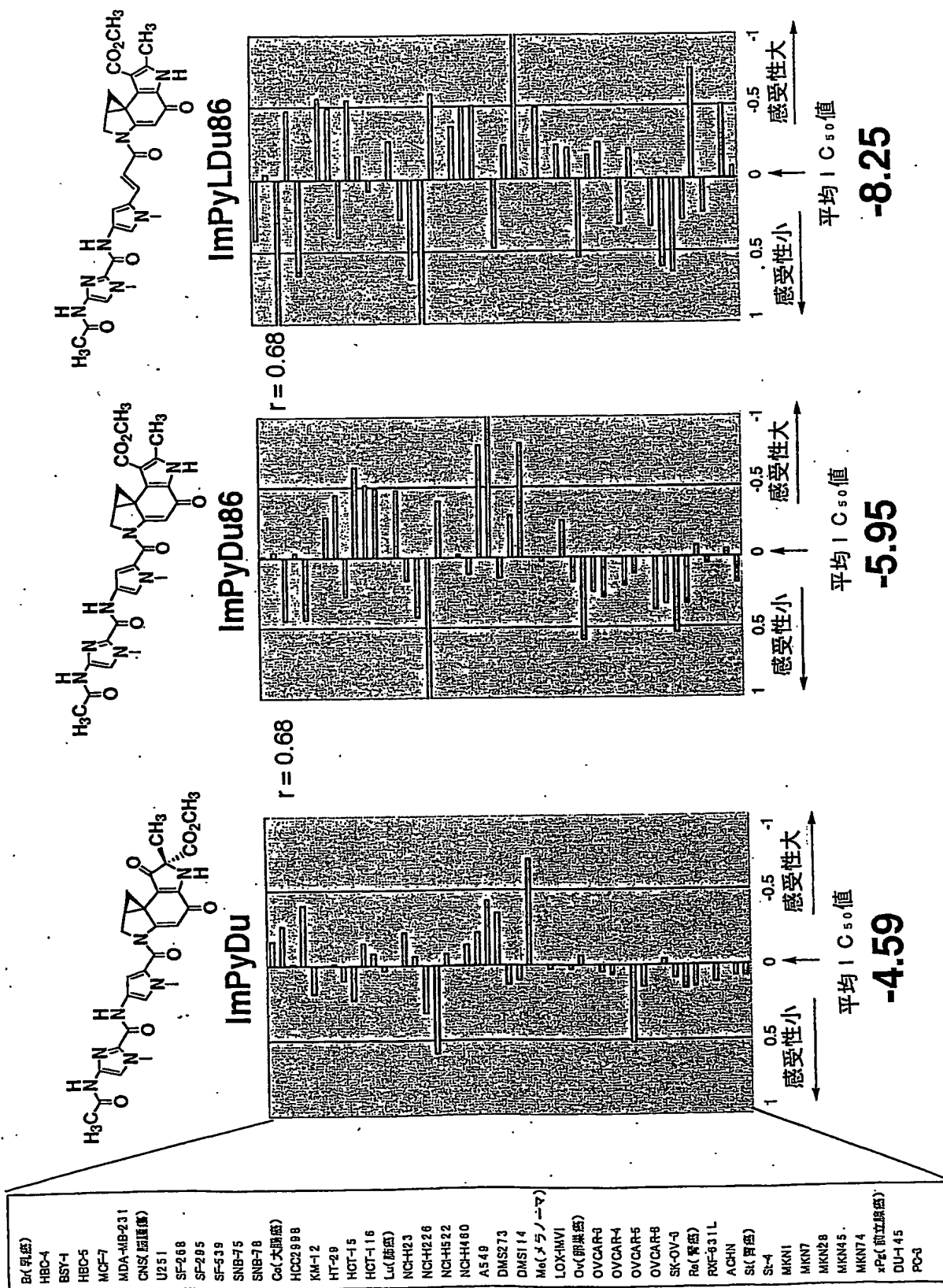
第 6 図



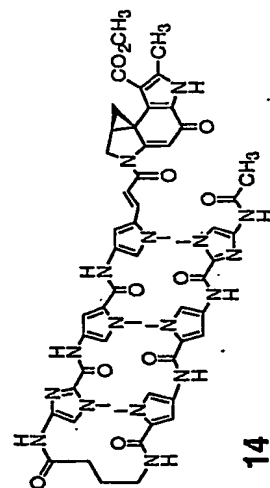
第 7 図



第 8 図



第 9 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02423

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07D233/90, 403/14, 487/04, A61K31/4178, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07D233/90, 403/14, 487/04, A61K31/4178

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/85733 A (Japan Science and Technology Corp.), 15 November, 2001 (15.11.01), & JP 2001-322992 A	1-12
A	WO 01/36677 A (Japan Science and Technology Corp.), 25 May, 2001 (25.05.01), & EP 1152011 A & JP 2001-136974 A	1-12
A	WO 00/15641 A (Japan Science and Technology Corp.), 23 March, 2000 (23.03.00), & JP 2000-159768 A	1-12

☐

Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 May, 2003 (12.05.03)

Date of mailing of the international search report
27 May, 2003 (27.05.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07D233/90, 403/14, 487/04, A61K31/4178, A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07D233/90, 403/14, 487/04, A61K31/4178

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 01/85733 A (科学技術振興事業団), 2001. 11. 15 & JP 2001-322992 A	1-12
A	WO 01/36677 A (科学技術振興事業団), 2001. 5. 25 & EP 1152011 A & JP 2001-136974 A	1-12
A	WO 00/15641 A (科学技術振興事業団), 2000. 3. 23 & JP 2000-159768 A	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.05.03

国際調査報告の発送日

27.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘實 謙二

4P

7433

電話番号 03-3581-1101 内線 3492